

SÉRIE : C
N° D'ORDRE : 49
N° DE SÉRIE : 4

THÈSE

présentée devant

L'UNIVERSITÉ DE RENNES

U.E.R. des Sciences du Comportement et de l'Environnement

pour obtenir

Le Titre de Docteur-Ingénieur

par

L. GARDAN

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DÉPÉRISSEMENT BACTÉRIEN
DU PÊCHER (BIOLOGIE ET TRAITEMENT DE *Ps. persicae*).

Soutenue le 17 Décembre 1975 devant la Commission d'Examen

M. S. VILLERET

M^{lle} M. ASTIB

MM. J. COUTAUD

F. MANGENOT

M. RIDE

Président

Examineurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551505_0009

SERIE : C

N° d'Ordre : 49

N° de Série : 4

THESE
présentée

DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES
U.E.R. des Sciences du comportement et de l'environnement.

pour obtenir

le titre de Docteur Ingénieur

par

L. GARDAN

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU DEPERISSEMENT BACTERIEN
DU PECHER (BIOLOGIE ET TRAITEMENT DE *Ps.persicae*).

Soutenue le 17 décembre 75 devant la Commission d'Examen

MM. S. VILLERET

Président

Melle M. ASTIE

M. J. COUTAUD

M. F. MANGENOT

M. M. RIDE

Examineurs

UNIVERSITE DE RENNES

U.E.R. SCIENCES ET PHILOSOPHIE

Doyens Honoraires

M. MILON Y.
M. TREHIN R.
M. SCHMITT M.
M. LE MOAL H.
M. MARTIN Y.
M. BOCLE J.

Professeurs Honoraires

M. FREYMANN R.
M. HAGENE P.
M. ROHMER R.
M. TREHIN R.
M. SALMON - LEGAGNEUR F.
M. des ABBAYES H.
M. MILON Y.

Maîtres de Conférences Honoraires

M. GRILLET L.
M. LECRECO A.

Mathématiques

Professeurs

M. GUERINDON Jean
M. METIVIER Michel
M. GIORGIUTTI Italo
M. TOUGERON Jean-Claude
M. MIGNOT Alain
M. HOUDEBINE Jean
M. KEANE Michaël
M. BOULAYE Guy

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

M. BERTHELOT Pierre
M. BREEN Lawrence
M. CAMUS Jacques
M. CONZE Pierre
M. FERRAND Daniel
M. GUIVARC'H Yves
M. LE GOUPIL Jean
M. LERMAN Israël
M. NEDELEC Jean-Claude
M. TRILLING Laurent
M. VERJUS Jean-Pierre

Physique

M. VACHER Michel
M. VIGNERON Léopold
M. LE BOT Jean
Mme ROBIN née SALOMOND
M. ROBIN Stéphane
M. LE MONTAGNER Serge
M. MEVEL Jean-Yves
M. MEINNEL Jean
M. REGENSTREIF Edouard
M. BRUN Pierre
M. LE ROUX Emile
M. DUBOST Gérard
M. ARQUES Pierre-Yves
M. HAEUSLER Claude
M. NUSIMOVICI Michel

M. GUIDINI J.
M. DECAMPS E.A.

Professeurs

Maîtres de Conférences & Chargés de Cours

Chimie

M. VENE Jean
M. LE MOAL Henri
M. LEVAS E.
M. PELTIER Daniel
M. PRIGENT J.
M. FOUCAUD André
M. LANG Jean
M. CARRIE R.
M. GUERILLOT Claude-Roger
M. KERFANTO Michel (E.N.S.C.R.)
M. DABARD René
M. GRANDJEAN Daniel
M. LUCAS Jacques
M. MARTIN Guy

M. TALLEC André

Chimie Biologique

M. JOUAN Pierre
M. DUVAL Jacques

Géologie

M. COGNE Jean
Mlle DURAND Suzanne
M. BOILLLOT Gilbert

M. HAMEURT Jean-Marie
M. LARDEUX Hubert

Zoologie

M. RICHARD Gaston
M. MAILLET Pierre
M. RAZET Pierre
M. FOLLIOU Roger
M. ALLEGRET Paul
M. MANIEY Jacques
M. JOLY Jean-Marie
M. LEFEUVRE J.C.

M. CALLEC Jean-Jacques

Botanique

M. VILLERET Serge
M. CLAUSTRES Georges
Mlle GOAS Gabrielle
Mlle GOAS Marie
Mme LEMOINE Cécile

M. TOUFFET Jean

Philosophie

M. ORTIGUES Edmond

M. JACQUES Francis
M. BEYSSADE Jean-Marie



ASPECT D'UN VERGER ATTEINT PAR LE DEPERISSEMENT BACTERIEN DU PECHEUR DU A *PSEUDOMONAS PERSICAE*.

A Monsieur le Professeur ALAIS,

A Monsieur le Professeur GAGNE.

Cette thèse a été réalisée à l'Institut National de la Recherche Agronomique, dans les laboratoires de la Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie d'Angers.

Monsieur le Professeur VILLERET a bien voulu s'intéresser d'emblée à mes recherches et me donner ses conseils qui m'ont permis de présenter aujourd'hui ce travail. Je tiens à le remercier d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Monsieur RIDE, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A. m'a accueilli dans son laboratoire et m'a témoigné sa confiance. Ses conseils m'ont aidé dans la poursuite de mes recherches. Je le remercie d'avoir bien voulu juger le résultat de mon travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur MANGENOT pour ses conseils stimulants qui m'ont permis de mener à bien mes recherches.

Monsieur le Professeur COUTAUD m'accueillit dans ses laboratoires pour mon mémoire de fin d'études et me permit ainsi d'affirmer ma vocation de chercheur et je le remercie d'avoir bien voulu faire partie des membres du jury.

Mademoiselle le Professeur ASTIE porte un grand intérêt aux recherches effectuées sur les maladies bactériennes des plantes et une collaboration fructueuse est maintenant établie entre l'Université d'Angers et la Station de Phytobactériologie de l'I.N.R.A. Je la remercie très sincèrement.

Je remercie aussi très chaleureusement, mes collègues PRUNIER et LUISETTI pour leur constante compréhension, leur soutien de tous les instants et leur amitié. La confrontation de nos idées et la réalisation matérielle du travail, m'ont permis de mener à terme les recherches dont certains résultats sont présentés dans cette thèse.

Je remercie tout particulièrement M. GAIGNARD pour son assistance technique dévouée et constante dans l'étude de cette nouvelle maladie et notamment pour la réalisation des essais de plein champ.

Je remercie aussi Madame OLIVIER pour sa patience, sa compétence et son aide apportée dans la réalisation matérielle de cette thèse.

INTRODUCTION

1. LES MALADIES BACTERIENNES DES ARBRES FRUITIERS	1
2. LES MALADIES A <i>PSEUDOMONAS</i> DES ARBRES FRUITIERS	2

CHAPITRE I.

LE DEPERISSEMENT BACTERIEN DU PECHER DU A *PS. PERSICAE* (PRUNIER, LUISETTI, GARDAN).

1. HISTORIQUE ET LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DE LA MALADIE	7
2. INTENSITE DES DEGATS	10
3. SYMPTOMATOLOGIE	10
31. Description des symptômes	10
311. En hiver	10
312. Au printemps	13
313. En été	13
32. Symptomatologie comparée des maladies à <i>Pseudomonas</i> des arbres fruitiers	13
4. LE GERME	15
41. Matériel et méthodes	15
42. Résultats	15
421. Le genre <i>Pseudomonas</i>	15
422. Détermination de l'espèce <i>Ps. persicae</i>	18
5. LE POUVOIR PATHOGENE DE <i>PS. PERSICAE</i>	20
51. Matériel et méthodes	21
52. Résultats	23
521. Réponse à un inoculum élevé (Ardèche 1968-69) ...	23
5211. Variation du pourcentage des réactions obtenues	23
5212. Variation de la longueur moyenne des nécroses	26
522. Effet de la dilution de l'inoculum (Versailles 1969-70).....	30
53. Conclusions	30
6. SENSIBILITE VARIETALE	31
7. CONCLUSION	32

CHAPITRE II.

VARIATION DES POPULATIONS DE *PS. PERSICAE* ET DES AUTRES BACTERIES SUR LA SURFACE DES FEUILLES ET DES FRUITS.

1. MISE AU POINT DE LA METHODE	36
11. Les travaux de CROSSE sur <i>Ps. mors-prunorum</i>	36
12. Culture de <i>Ps. persicae</i>	36
13. Durée d'agitation	39
14. Grandeur de l'échantillon	42
15. Conclusion	43
2. RESULTATS	44
21. Etude des variations de <i>Ps. persicae</i> sur les feuilles .	44
211. Le matériel végétal	44
212. Présence sur les feuilles de <i>Ps. persicae</i>	44
213. Variation des différents constituants de la microflore de surface des feuilles	47
2131. Année 1969	47
2132. Année 1970	47
22. Variations de <i>Ps. persicae</i> sur la surface des fleurs et des fruits	51
3. INVENTAIRE SOMMAIRE DES GERMES PRESENTS SUR LA FEUILLE	51
31. Les <i>Pseudomonas</i>	51
32. Les autres groupes de bactéries	53
33. Présence de bactéries antagonistes de <i>Ps. persicae</i>	56
331. Appréciation du pouvoir antagoniste	56
332. Résultats	56
4. CONCLUSION	57
41. Présence de <i>Ps. persicae</i> sur la surface des feuilles de Pêcher	57
42. La vie épiphyllle des bactéries phytopathogènes	57
43. La méthode de détection	58
44. Les facteurs conditionnant la vie épiphyte des bactéries	58
45. La composition de la microflore bactérienne épiphyllle .	59
46. Interactions bactériennes au niveau de la feuille	59

CHAPITRE III.

LA LUTTE CONTRE *PS. PERSICAE*

1. LE CYCLE BIOLOGIQUE DE <i>PS. PERSICAE</i>	63
2. LES DIFFERENTS MOYENS DE LUTTE	64
21. Les mesures prophylactiques	64
22. La lutte biologique	65
23. La lutte chimique	65
3. MISE AU POINT DE LA LUTTE CHIMIQUE	66
31. Concentration minima inhibitrice (CMI) des produits antibactériens contre <i>Ps. persicae</i>	66
311. Méthode de détermination de la CMI	66
312. Résultats	68
313. Nature des substances utilisées	68
3131. Le T.M.Q. composé d'ammonium quaternaire (Q) de Terramycine (T.M.)	68
3132. Les produits cupriques	69
3133. Le bronopol	71
32. Etude de l'activité in vivo	71
321. Conditions d'expérimentation	71
322. Essais parcellaires	73
3221. Essai Angers du 26 juillet au 10 août 1971	73
3222. Essai Angers du 11 au 26 septembre 1972 .	76
3223. Résultats	76
3224. Conclusions	78
323. Essais d'automne en Ardèche	78
3231. Conditions de l'essai	81
3232. Résultats	81
32321. Incidence des traitements sur les populations bactériennes	81
32322. Effet des produits sur le nombre de nécroses	83
32323. Incidence des traitements sur la vigueur des arbres	84
3233. Conclusions	86
4. PROBLEMES POSES PAR LA LUTTE CHIMIQUE	86
41. Résistance chromosomique	86
42. Résistance extra-chromosomique	87
CONCLUSION	89
BIBLIOGRAPHIE	90

1. TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des maladies bactériennes existant en France	1
Tableau 2 : Résumé des principaux points de la symptomatologie	9
Tableau 3 : Symptomatologie comparée des maladies à <i>Pseudomonas</i> des arbres fruitiers	14
Tableau 4 : Schéma de détermination des <i>Pseudomonas</i> fluorescents phytopathogènes (d'après LELLIOTT, BILLING, HAYWARD, 1966)	16
Tableau 5 : Diagnostic différentiel des <i>Pseudomonas</i> des arbres fruitiers .	18
Tableau 6 : Caractères lysotypiques des <i>Pseudomonas</i> des arbres fruitiers .	19
Tableau 7 : Eléments remarquables des courbes d'évolution de la longueur moyenne des nécroses	27
Tableau 8 : Echelle de sensibilité à <i>Ps. persicae</i> , des variétés de Pêcher cultivées en France	31
Tableau 9 : Matériel végétal ayant servi aux prélèvements réguliers de feuilles	43
Tableau 10: Principaux caractères des <i>Pseudomonas</i> fluorescents isolés de la flore épiphyte du Pêcher	52
Tableau 11: Concentration minima inhibitrice (µg/ml) de quelques bactéries phytopathogènes vis à vis de quelques substances	67
Tableau 12: Influence de la date de pulvérisation sur la durée de survie de <i>Ps. persicae</i> sur les feuilles	70 bis
Tableau 13: Essai parcellaire du 26 juillet au 10 août 1971. Variations du nombre de bactéries par feuille après un traitement bactéricide	72
Tableau 14: Essai parcellaire du 11 au 26 septembre 1972. Variations du nombre de bactéries par feuille après plusieurs traitements bactéricides.....	74
Tableau 15: Essai parcellaire. Efficacité comparée de diverses substances seules ou en combinaison sur les populations de <i>Ps. persicae</i> , sur la surface des feuilles de Pêcher	77
Tableau 16: Essai d'automne chez GAMON. Variations du nombre de bactéries par feuille après 4 traitements bactéricides	80
Tableaux 17, 18, 19 : Analyse statistique. Essai d'automne chez GAMON. Nombre de nécroses autour des bourgeons dormants. Analyse de variance. Classement selon les ranges de DUNCAN.	82
Tableau 20: Vigueur des arbres.	84

2. FIGURES

Figure 1 : 1a : Localisation du dépérissement bactérien du Pêcher en France	5
1b : Principaux départements producteurs de pêches	6
1c : Localisation de la production dans la Moyenne Vallée du Rhône	6
1d : Localisation de la production dans le Sud - Est	6
Figure 2 : Nombre d'arbres indemnisés et montant des indemnités versées (en francs) aux agriculteurs de l'Ardèche de 1967 à 1973	8
Figure 3 : Répartition dans l'année du pourcentage de réactions d'infection (réactions typiques) et de réactions atypiques	22
Figure 4 : Pourcentage des réactions d'infection, réactions atypiques et réactions négatives obtenues après inoculation de la bactérie , en automne et en hiver sur plaies pétiolaires.....	24
Figure 5 : Pourcentage de réactions d'infection, réactions atypiques et réactions négatives, obtenues après inoculation de la bactérie en automne et en hiver, sur incisions (blessures)	25
Figure 6 : Longueur moyenne cumulée des nécroses obtenues dans le temps, après inoculation sur plaies pétiolaires, en fonction de la date d'inoculation.	28
Figure 7 : Longueur moyenne cumulée des nécroses obtenues dans le temps, après inoculation sur incisions (blessures), en fonction de la date d'inoculation.....	29
Figure 8 : Logarithme du nombre de bactéries par feuille en fonction du temps d'agitation : expérience du 29 MAI	37
Figure 9 : Logarithme du nombre de bactéries par feuille en fonction du temps d'agitation : expérience du 23 octobre	38
Figure 10: Logarithme du nombre de bactéries par feuille en fonction de la grandeur de l'échantillon (6 à 200 feuilles).....	40
Figure 11: Logarithme du nombre de bactéries par feuille en fonction de la grandeur de l'échantillon (1 à 75 feuilles)	41
Figure 12: Variations du nombre de <i>Ps. persicae</i> présents sur les feuilles dans 3 vergers : J.H.Hale 3 ans, Michelini 5 ans et Cardinal 4 ans, année 1969.....	45
Figure 13: Variations du nombre de microorganismes par feuille (<i>Ps. persicae</i> , <i>Pullularia pullulans</i> et autres bactéries) : J.H. Hale 3 ans, année 1969	46
Figure 14: Variations du nombre de <i>Ps. persicae</i> présents sur les feuilles dans 4 vergers : J.H.Hale 4 ans, J.H.Hale 5 ans, Redhaven 6 ans, Fairhaven 7 ans, année 1970	48
Figure 15: Variations du nombre de microorganismes par feuille (<i>Ps. persicae</i> , <i>Pullularia pullulans</i> et autres bactéries) : J.H.Hale 4 ans, année 1970.	49
Figure 16: Variations du nombre de <i>Ps. persicae</i> par fleur et par fruit dans 3 vergers : J.H.Hale, Loring et Fair Haven, année 1971 .	50
Figure 17: Cycle biologique de <i>Ps. persicae</i>	62

Figure 18: Evolution du nombre de <i>Ps. persicae</i> après pulvérisation de la bactérie sur les feuilles	70
Figure 19: Essai parcellaire du 26 juillet au 10 août 1971. Evolution du nombre de bactéries par feuille (chiffres transformés), après un traitement bactéricide au T.M.Q.	72 bis
Figure 20: Essai parcellaire du 11 au 26 septembre 1972. Evolution du nombre de bactéries par feuille (chiffres transformés), après plusieurs traitements bactéricides.....	75
Figure 21: Essai d'automne chez GAMON. Variation du nombre de bactéries par feuille (chiffres transformés), après quatre traitements bactéricides	79

3. PHOTOGRAPHIES

Planche 1: SYMPTOMES DE LA MALADIE	11
Photographie n°1: Nécrose autour d'un bourgeon dormant.	
Photographie n°2: Détail d'arbre malade : rameaux mixtes morts, jeunes feuilles et fruits desséchés	
Photographie n°3: Chancre avec bourrelet cicatriciel, développé à partir d'une plaie de taille.	
Planche 2 :	
Photographie n°4: Aspect d'un arbre malade : 2 charpentières sur 3 mortes.....	12
Photographie n°5: Taches et criblure sur feuille, localisées sur la moitié inférieure de la feuille.	
Photographie n°6: Exsudat de gomme sur jeune fruit	
Photographie n°7: Aspect d'un arbre malade flétrissant en été, longtemps après le départ de la végétation.	
Planche 3: MISE EN EVIDENCE DU POUVOIR ANTAGONISTE DE BACTERIES ISOLEES DE LA SURFACE DES FEUILLES DE PECHER	55
Photographie n°8: Trois souches sont antagonistes de <i>Ps.persicae</i> : B 37 R (<i>Erwinia herbicola</i>), B95R1 (<i>Acinetobacter sp.</i>), F45R1 (<i>Bacillus sp.</i>). La souche Ab34aR2 (<i>Erwinia herbicola</i>) n'est pas antagoniste.	
Photographie n°9: Les souches D269bR1 (<i>Pseudomonas fluorescent</i>), B266R1 (<i>Acinetobacter sp.</i>) sont fortement antagonistes de <i>Ps. persicae</i> , alors que 2 isolats de C177 (<i>Pseudomonas fluorescent</i>) sont faiblement antagonistes.	

I N T R O D U C T I O N

LES MALADIES BACTERIENNES

DES ARBRES FRUITIERS.

1. LES MALADIES BACTERIENNES DES ARBRES FRUITIERS

Les maladies bactériennes des plantes ne sont étudiées en France que depuis une trentaine d'années. Le peu d'intérêt porté jusqu'alors à ce groupe d'affections était sans doute dû au nombre limité des maladies connues, et à leur incidence économique faible, par rapport à celle causée par les affections d'étiologie virale et fongique. La liste des maladies bactériennes recensées dans notre pays s'allonge chaque année, qu'il s'agisse de maladies introduites de l'étranger ou apparues sur place, et les dégâts occasionnés sont parfois très importants.

Les maladies bactériennes des arbres fruitiers furent les premières à attirer l'attention des chercheurs. Le tableau 1 donne la liste exhaustive du nom des maladies présentes en France et des espèces pathogènes correspondantes.

TABEAU 1. LISTE DES MALADIES BACTERIENNES EXISTANT EN FRANCE SUR LES ARBRES FRUITIERS.

Espèces pathogènes	Maladies et hôtes sensibles
<i>Erwinia amylovora</i> (BURRILL) WINSLOW	Feu bactérien du Poirier, du Pommier et des Rosacées ornementales et sauvages.
<i>Xanthomonas juglandis</i> (PIERCE) DOWSON	Bactériose du Noyer.
<i>Xanthomonas corylina</i> (MILLER et al) STARR et BURKHOLDER	Bactériose du Noisetier.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (SMITH et TOWNSEND) CONN, <i>Agrobacterium rhizogenes</i> (RIKER et al.) CONN	Galle du collet et galle chevelue de différents arbres fruitiers.
<i>Pseudomonas savastanoi</i> (SMITH) STEVENS	Tuberculose de l'Olivier.
<i>Pseudomonas mors-prunorum</i> WORMALD	Chancre bactérien du Cerisier et du Prunier.
<i>Pseudomonas syringae</i> VAN HALL	Déssèchement bactérien des pousses de Poirier. Dépérissement bactérien de l'Abri-cotier et du Prunier. Chancre bactérien du Pêcher et du Cerisier aux E.U.A. Différentes affections (taches sur feuilles, nécroses sur jeunes pousses, chancres) sur Cerisier, Amandier, Pêcher, agrumes, Noyer, Prunier etc...

Espèces pathogènes	Maladies et hôtes sensibles
<i>Pseudomonas viridiflava</i> (BURKHOLDER) DOWSON	Dépérissement bactérien de l'Abricotier et certains symptômes sur Cerisier.
<i>Pseudomonas mors-prunorum</i> f. <i>sp. persicae</i> * PRUNIER, LUISETTI, GARDAN	Dépérissement bactérien du Pêcher.

* Dans la suite du texte le germe sera dénommé plus simplement : *Ps. persicae*.

Certaines de ces maladies comme la tuberculose de l'Olivier et la Bactériose du Noyer existent sans doute dans notre pays depuis longtemps (RIDE, 1960; JOUANNEAU, 1960), alors que d'autres, comme le Feu bactérien (SAMSON, PAULIN, RIDE, 1973) et la bactériose du Noisetier (LUISETTI et al, 1975) ont été introduites récemment. Le dépérissement bactérien du Pêcher dont cette thèse fera l'objet est apparue dans la moyenne Vallée du Rhône vers 1965-1966.

Les espèces bactériennes responsables des maladies des arbres fruitiers, appartiennent à 4 genres: *ERWINIA*, *AGROBACTERIUM*, *XANTHOMONAS* et *PSEUDOMONAS* (RIDE, 1968); nous nous intéresserons particulièrement au genre *Pseudomonas*, en mettant de côté l'espèce *Ps. savastanoi* qui provoque des tumeurs sur l'Olivier.

2. LES MALADIES A *PSEUDOMONAS* DES ARBRES FRUITIERS

Comme l'indique le tableau 1, en plus de *Ps. savastanoi* responsable de la tuberculose de l'Olivier, les *Pseudomonas* responsables des maladies sur les arbres fruitiers sont *Ps. mors-prunorum* agent du chancre bactérien du Cerisier et du Prunier, *Ps. syringae* et *Ps. viridiflava* occasionnant différents types d'affections sur un grand nombre d'hôtes.

Ps. mors-prunorum est signalé principalement en Europe (Grande-Bretagne, France etc...) mais aussi en Australie, au Canada et en Afrique du Sud. Il provoque des chancres sur rameaux et surtout sur tronc avec exsudat de gomme, des taches sur feuilles, des flétrissements de pousses et d'arbre entier, sur les arbres fruitiers à noyaux et surtout sur le Cerisier et le Prunier (BRADBURY, 1967). Aux Etats-Unis le chancre bactérien du Cerisier est attribué à *Ps. syringae* (CAMERON, 1962).

Ps. syringae est présent dans toutes les parties du monde où sont cultivés les arbres fruitiers à noyaux (HAYWARD, WATERSON, 1965) sur lesquels il provoque des écoulements de gomme sur les branches, le tronc et les fruits, des chancres sur les branches et le tronc, des flétrissements de bourgeons à bois, de bouquets floraux, de jeunes pousses, de branches et d'arbres entiers, et des taches sur feuille suivies de criblures. Les symptômes sont souvent difficiles à diffé-

rencier de ceux provoqués par *Ps. mors-prunorum*, d'autant plus qu'il est possible de trouver ces deux germes sur le même arbre comme c'est le cas en France sur Cerisier.

Le dépérissement de l'Abricotier dû à *Ps. syringae* est signalé aux E.U.A. (WILSON, 1931, 1933), en Grande-Bretagne (CROSSE, 1953a) en Afrique du Sud (HEYNS 1960, 1969), en Yougoslavie (ARSENIJEVIC, 1968) en Hongrie (ROZSNAY, KLEMENT, VISNYOVSKY, 1971), et en France (GARDAN, PRUNIER, LUISETTI, 1973a) où une autre bactérie *Ps. viridiflava* est également en cause.

Le chancre bactérien du Prunier est attribué à *Ps. syringae* aux Etats Unis (OTTA, ENGLISH, 1970), en France (RIDE, 1962) et à *Ps. mors-prunorum* en Grande Bretagne (CROSSE, 1953b).

Le dessèchement bactérien des pousses de Poirier occasionné par *Ps. syringae*, existe en Amérique du Nord, en Nouvelle Zélande, en Australie, en Grèce (PANAGOPOULOS, CROSSE, 1964) et en France (RIDE, SUTIC, 1957); cette bactérie provoque au printemps des dessèchements de pousses herbacées et des bouquets floraux, des nécroses sur bois plus âgé, des taches nécrotiques sur les fruits et sur ^{le}limbe des feuilles qui se déforme. Des nécroses sont occasionnellement observées au printemps sur jeunes pousses herbacées et feuilles de Pêcher en France (RIDE, 1961). Les dégâts observés sur Citrus en Grèce par PANAGOPOULOS (1966) se rapprochent de ceux rencontrés sur Poirier.

Sur Pêcher, certains dépérissements attribués à *Ps. syringae* sont relatés depuis longtemps par WILSON (1933), plus récemment aux Etats-Unis par DOWLER et PETERSEN (1963) et en Nouvelle Zélande par DYE (1964). Les symptômes sont des chancres sur rameaux, des flétrissements de charpentières et des morts d'arbres entiers.

Au printemps 1966, dans la moyenne Vallée du Rhône sur le plateau de Tournon en Ardèche, les arboriculteurs ont observé des mortalités de nombreux Pêchers qui seront ensuite attribuées à une nouvelle bactérie : *Pseudomonas persicae*.

CHAPITRE I

LE DEPERISSEMENT BACTERIEN DU PECHER DU A

PS. PERSICAE (PRUNIER, LUISETTI, GARDAN).



Fig. 1a : LOCALISATION DU DEPERISSEMENT BACTERIEN DU PECHER
EN FRANCE.

PRINCIPAUX DEPARTEMENTS PRODUCTEURS DE PECHEES
Production récoltée SCEES 1970-1971

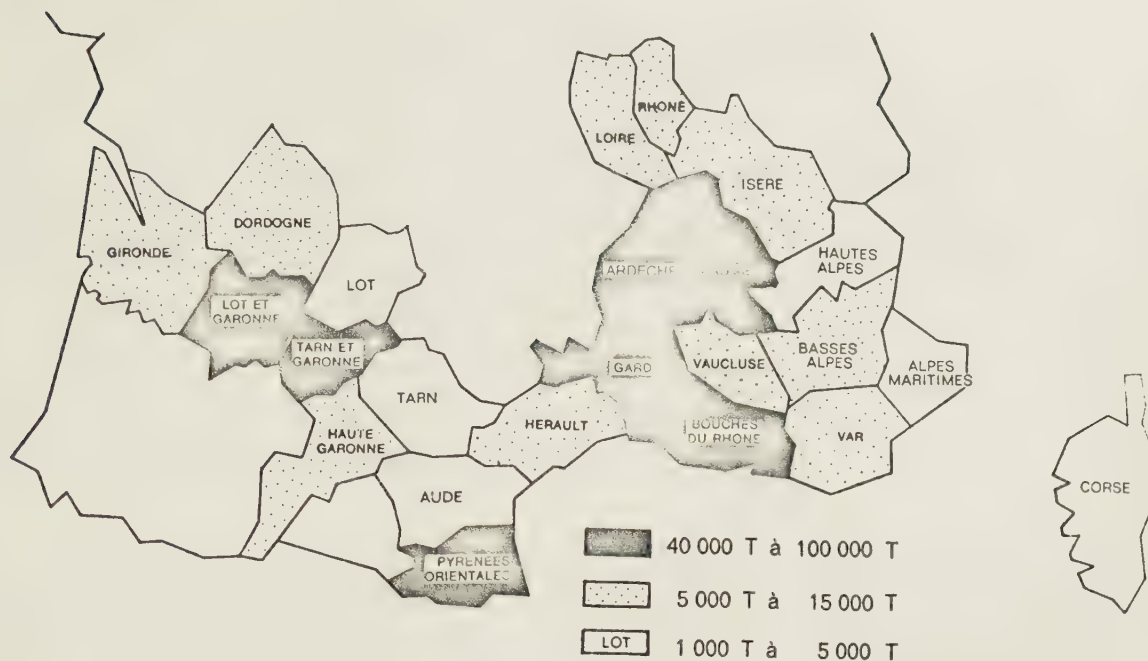


fig.1b

SUD-EST

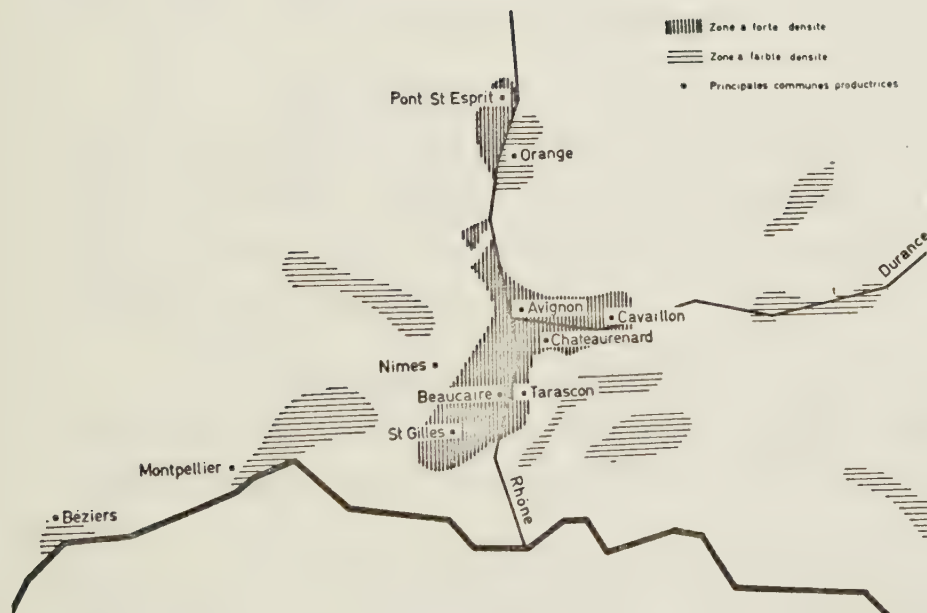


fig.1c

MOYENNE VALLEE DU RHONE



fig.1d

Figures 1b, 1c, 1d. LOCALISATION DE LA PRODUCTION DE PECHEES EN FRANCE.

fig. 1b : Principaux départements producteurs de pêches.

fig. 1c, 1d : Concentration de la production de pêches dans le Sud-est et la Moyenne vallée du Rhône.

1. HISTORIQUE ET LOCALISATION GEOGRAPHIQUE DE LA MALADIE

Aux printemps 1965 et 1966, les arboriculteurs du Nord de l'Ardèche constatent le dépérissement progressif et la mort de nombreux arbres dans leurs vergers (VIGOUROUX, BLACHE, 1967). L'asphyxie radiculaire semble être la cause de la mortalité de certains arbres (DEFONTAINES, 1967). L'importance des dégâts constatés et l'aspect de certains symptômes attirent vite l'attention des phytopathologistes de l'I.N.R.A. En janvier 1967 une bactérie est isolée à partir de nécroses localisées autour des bourgeons dormants et l'inoculation de ce germe à de jeunes rameaux de Pêcher l'automne suivant permet de reproduire certaines lésions naturelles (VIGOUROUX, 1968).

Les premiers cas de dépérissement sont observés à Colombier-le-Jeune et à Gilhoc, communes situées sur le Plateau de Tournon en Moyen-Vivarais. Une enquête épidémiologique effectuée au cours de l'hiver 1968 et du printemps 1969, avec visite systématique des vergers et prélèvements d'échantillons pour confirmer le diagnostic de la maladie par des analyses bactériologiques, a permis de prouver la présence de la maladie dans 20 communes du département de l'Ardèche et dans 12 communes de 4 autres départements : Drôme, Isère, Loire, Rhône (fig.1a), (GARDAN, PRUNIER, LUISETTI, 1969).

Durant la période 1970 à 1973 des foyers sont identifiés dans de nouvelles communes : 20 dans l'Ardèche et 4 dans l'Isère et la Loire. L'extension du dépérissement bactérien du Pêcher est confirmée en 1974 et en 1975 puisque deux nouveaux foyers très éloignés de ceux déjà connus ont été trouvés dans la Drôme et le Gard (fig. 1a).

La production de pêches qui a atteint 569 550 tonnes en 1971 est localisée dans le sud de la France et 17 départements assurent 95 % de la récolte. Mais 7 départements assurent à eux seuls, 85 % de la production (fig.1b).

En 1972, la majeure partie de la production de pêches se répartit, par ordre d'importance décroissante, de la façon suivante : Drôme 91 000 T, Ardèche 82 000 T, Gard 75 000 T, Pyrénées-orientales 63 000 T, Tarn-et-Garonne 60 000 T, Bouches-du-Rhône 47 000 T, Lot-et-Garonne 42 000 T (C.T.I.F.L., 1973, fig.1b).

Le dépérissement bactérien du Pêcher qui est apparu en 1966 dans la moyenne Vallée du Rhône et en 1974 dans le sud-est, dans deux zones importantes de culture du Pêcher (fig. 1c, 1d), peut donc limiter et compromettre la production de pêches dans ces deux régions.

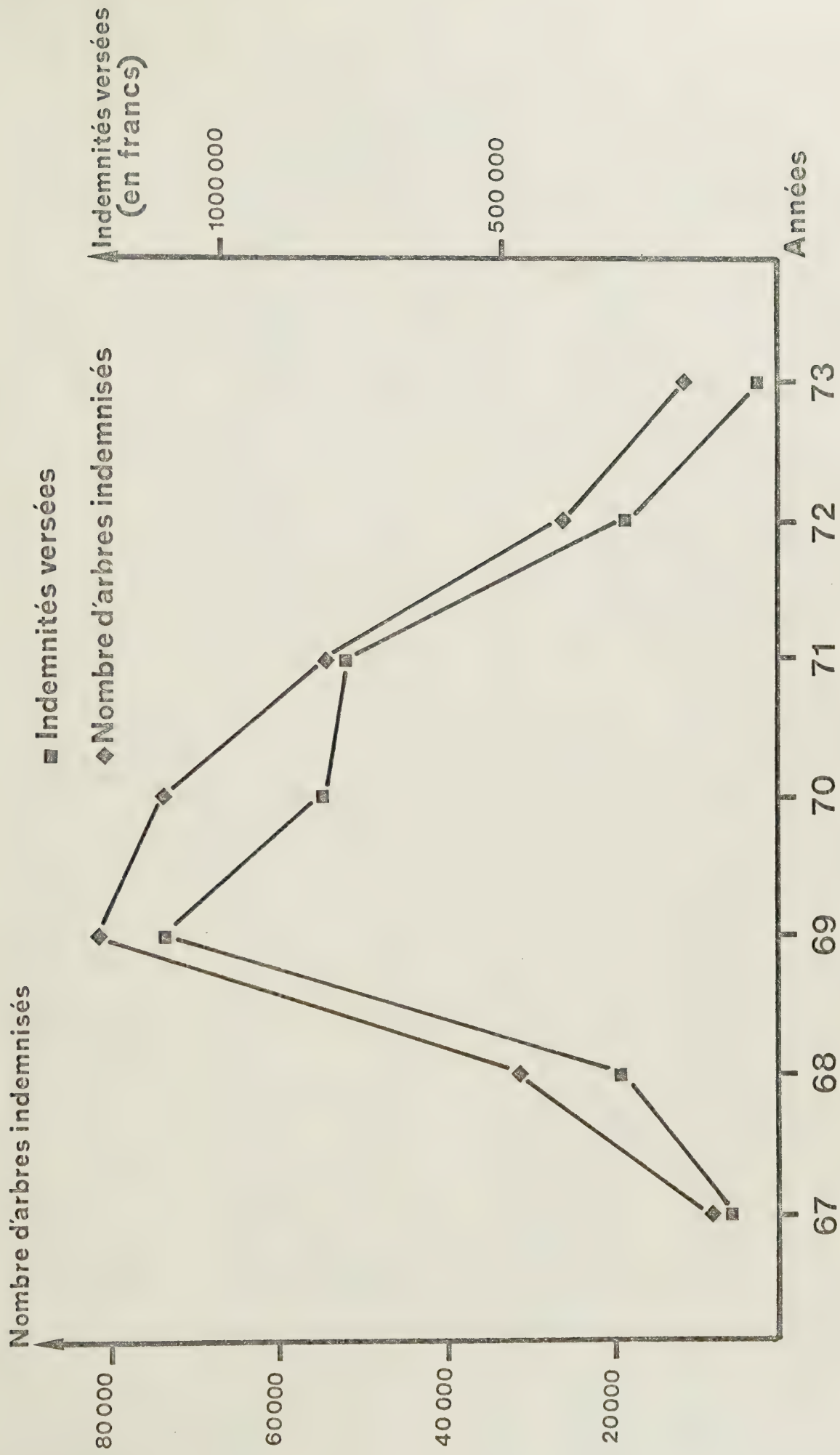


Fig. 2. NOMBRE D'ARBRES INDEMNISES ET MONTANT DES INDEMNITES VERSEES (EN FRANCS) AUX AGRICULTEURS DE L'ARDECHE DE 1967 A 1973.

Symptômes	Bourgeons dormants	Rameaux mixtes et anticipés	Charpentière et tronc	Feuilles	Fruits	Arbre entier
HIVER	• plages vitreuses	• nécrose café au lait	• nécroses centrées sur plaies de taille et rameaux mixtes malades			• mort (parfois)
	• petit chancre avec exsudat de gomme • mort et non débourement	• dessèchement	• mort • chancre à méplat • exsudat de gomme	• tache avec halo vitreux fugace • criblure	• exsudat gommeux et nécrose sous-jacente vitreuse • chute précoce	• mort • flétrissement de rameaux branches et charpentières
ETE	• chancre craquelé	• flétrissement tardif	• flétrissement • exsudat de gomme	• criblure • chute	• chute • déformations • exsudat gommeux	• flétrissement et mort de tout ou partie de l'arbre
AUTOMNE	• Chancre avec bourrelet cicatriciel • parfois exsudat de gomme			• criblure		
PRESENCE DE LA BACTERIE	• Dans les tissus malades en hiver et au printemps ainsi qu'au début de l'été			• toute la période de végétative sur la surface • dans les taches	• sur la surface jusqu'avant la maturation • dans les taches	
	• Facile en hiver et au printemps mais difficile en été et en automne à partir des organes malades			• tache au printemps • par lavage durant toute la végétation	• par lavage • à partir des nécroses au printemps et début de l'été	

TABLEAU 2. RESUME DES PRINCIPAUX POINTS DE LA SYMPTOMATOLOGIE

On a cru tout d'abord que cette maladie était liée aux conditions écologiques précises du Moyen-Vivaraïs (plateau situé entre une altitude de 400 à 600 mètres, sol d'origine granitique à pH acide, etc...), mais il a été montré expérimentalement, que cette affection pouvait se développer sous des conditions écologiques variées, correspondant à celles de la culture du Pêcher en France. Cette nouvelle maladie peut donc encore s'étendre dans les Pyrénées Orientales et la Vallée de la Garonne.

2. INTENSITE DES DEGATS

Le pouvoir de destruction de cette bactérie est important puisqu'il aboutit à la mort des jeunes arbres en une année et à la destruction d'une ou plusieurs charpentières ou des arbres entiers, plus âgés, en un à trois ans.

Dans les vergers atteints, les pourcentages d'arbres morts observés, varient de 20 à 80; les parcelles où la mortalité des arbres est supérieure à 30 %, ne sont plus rentables sur le plan de l'exploitation et sont systématiquement détruites. Les arbres arrachés doivent être brûlés car la bactérie peut se conserver dans le bois mort.

La fig. 2 montre que, pour le département de l'Ardèche, le nombre d'arbres indemnisés et corrélativement le montant des indemnités versées aux arboriculteurs, est très élevé en 1969, 1970 et en 1971. En 1973 et 1974 la mortalité des arbres a beaucoup diminué, alors qu'en 1975 nous avons assisté à une recrudescence de la maladie favorisée par les conditions climatiques d'hiver et de printemps. Plus de 450 000 francs d'indemnités (en moyenne 12 francs par arbre arraché), ont été versées aux arboriculteurs ardéchois pour compenser les frais occasionnés par l'arrachage des arbres. Plus de 600 ha de vergers de Pêchers ont été détruits par cette maladie.

3. SYMPTOMATOLOGIE

Le tableau 2 résume les symptômes observés sur les rameaux mixtes, les charpentières, le tronc, les feuilles et les fruits (PRUNIER, LUISETTI, GARDAN, 1970; VIGOUROUX, 1970).

31. Description des symptômes

311. En hiver

Fin décembre, début janvier apparaissent, centrées autour des bourgeons dormants, des plages vitreuses qui ressortent sur le fond vert de la partie du rameau non exposée aux rayons solaires (photo n°1, planche 1); sur la face colorée par les pigments anthocyaniques, ces nécroses sont de couleur brun-rouge foncé. En janvier février, ces nécroses progressent rapidement le long des rameaux pour atteindre 30 à 40 cm. Les parties mortes prennent une couleur



Planche 1 : SYMPTOMES DE LA MALADIES

Photographie n°1 : Nécrose autour d'un bourgeon dormant.

Photographie n°2 : Détail d'arbre malade : rameaux mixtes morts, jeunes feuilles et fruits desséchés.

Photographie n°3 : Chancre avec bourrelet cicatriciel, développé à partir d'une plaie de taille.

Photographie n°4 : Aspect d'un arbre malade.

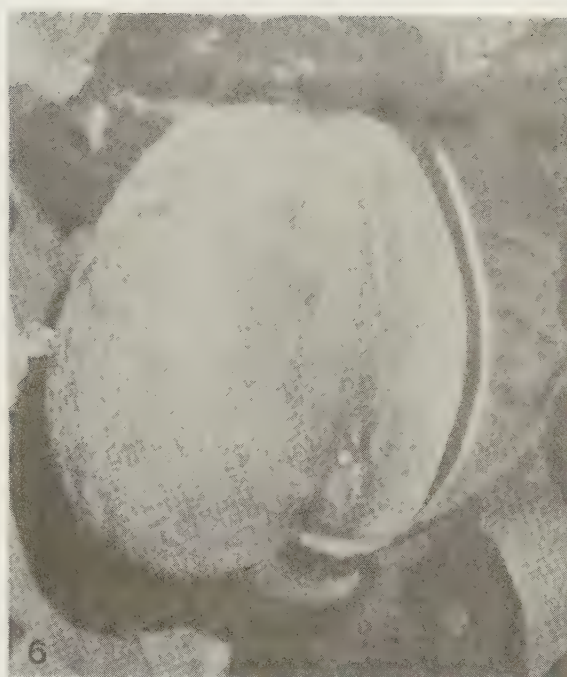
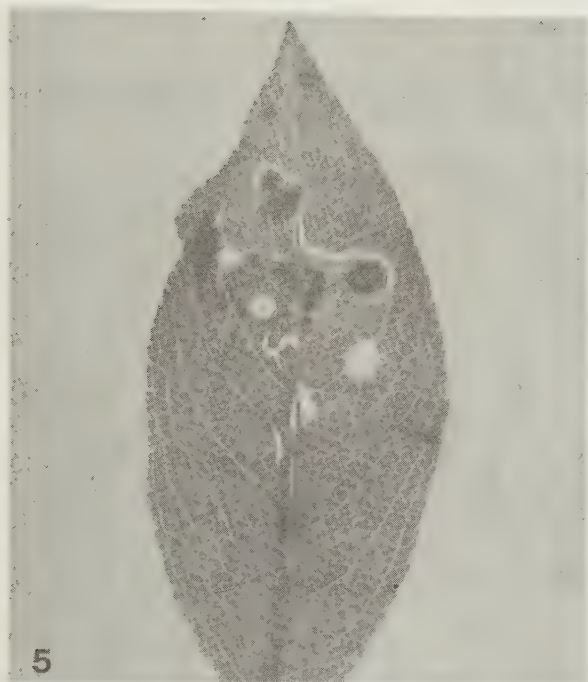


Planche 2 : SYMPTOMES DE LA MALADIE.

Photographie n°5 : taches et criblures sur feuille, localisées sur la moitié inférieure de la feuille.

Photographie n°6 : exsudat de gomme sur jeune fruit.

Photographie n°7 : aspect d'un arbre malade, flétrissant en été et longtemps après le départ de la végétation.

café au lait et dégagent une odeur de fermentation caractéristique.

Sur les branches et les charpentières, à partir des plaies de taille, des rameaux mixtes morts, ou de tout autre blessure, apparaît une nécrose qui aboutit à la mort de l'organe (photo n°2, planche 1), ou à un chancre plus ou moins développé qui arrêtera son évolution lors du débourrement (photo n°3, planche 1).

312. Au printemps

L'activité de la bactérie dans les tissus diminue rapidement après le départ de la végétation, alors que le résultat des attaques hivernales se manifeste : mort des rameaux, branches et charpentières (photo n°4, planche 1). Un exsudat gommeux plus ou moins important apparaît à la limite des zones saines et malades.

Sur les feuilles, des taches brunes cernées d'un halo translucide fugace évoluent en criblure par décollement des parties mortes du limbe (photo n°5, planche 2).

Sur les jeunes fruits, une gomme d'abord blanche puis brune exsude de nécroses vitreuses sous-jacentes, localisées fréquemment à la base du pistil et au niveau de l'attache du pédoncule ou de tout autre partie du fruit (photo n°6, planche 2). Une chute prématurée des fruits atteints précocement est parfois observée, alors que les autres fruits malades restés sur l'arbre montrent des déformations, ce qui les rendra impropres à la vente.

313. En été

L'évolution des nécroses sur fruits diminue rapidement et la bactérie disparaît des lésions. Des dessèchements partiels de rameaux, de charpentières ou d'arbres entiers sont encore observés, notamment en période de sécheresse (photo n°7, planche 2).

32. Symptomatologie comparée des maladies à *Pseudomonas* des arbres fruitiers.

Comme le montre le tableau 3, il existe une grande convergence de symptômes entre les maladies à *Pseudomonas* des arbres fruitiers à noyaux (Pêcher, Abricotier, Prunier, Cerisier); il subsiste cependant quelques différences entre les maladies dues à *Ps. mors-prunorum* et à *Ps. syringae*, notamment au niveau de la biologie des bactéries. L'analogie entre le dépérissement bactérien du Pêcher et le chancre bactérien du Cerisier est très grande.

	Dessèchement bactérien des pousses de Poirier (<i>Ps. syringae</i>)	Chancres bactériens du Pêcher (E.U.A.) (<i>Ps. syringae</i>)	Dépérissement bactérien de l'Abricotier et du Cerisier (<i>Ps. syringae</i> et <i>Ps. viridiflava</i>)	Chancres bactériens du Cerisier et du Prunier (<i>Ps. mors-prunorum</i>)	Dépérissement bactérien du Pêcher (<i>Ps. persicae</i>)
Nécroses autour des bourgeons dormants en hiver	-	+ ?	+ ?	+	+
Nécroses sur pousses herbacées au printemps	+	-	-	-	-
Taches sur feuilles et fruits	+	+	+ ?	+	+
Chancres sur rameaux et charpentières	Papyracé	à méplat	à méplat	à méplat	à méplat
Mortalité de charpentières et d'arbres entiers	-	+	+	+	+
Exsudat de gomme	-	+	+	+	+
Présence de la bactérie sur la surface des feuilles	+	+	+	+	+
Mode de conservation de la bactérie en hiver	dans ou sur les bourgeons ?	dans les tissus et les bourgeons	dans les tissus dans ou sur les bourgeons	dans les tissus	dans les tissus
Pénétration de la bactérie par les plaies pétiolaires	-	+ ?	+ ?	+	+

TABLEAU 3. SYMPTOMATOLOGIE COMPAREE DES MALADIES A *PSEUDOMONAS* DES ARBRES FRUITIERS.

Le dessèchement bactérien des pousses de Poirier se différencie très nettement des autres maladies à *Pseudomonas* des arbres fruitiers par ses attaques au printemps sur jeunes pousses herbacées, les fleurs et les fruits à la faveur des dégâts de gel.

La nécrose hivernale des rameaux qui est un trouble physiologique complexe, est un accident fréquent chez le Pêcher en France; elle se manifeste par une nécrose brune à marge bien nette, localisée entre deux bourgeons, le long du rameau ^{au niveau/} de plusieurs bourgeons ou sur le rameau entier qui meurt. Cet accident peut être la conséquence de traitements pesticides (Tirame) et coïncide avec des modifications biochimiques profondes de l'arbre (GROSCLAUDE, 1969). La nécrose hivernale se différencie du dépérissement bactérien du Pêcher par sa localisation exclusive sur les rameaux de l'année entre les bourgeons et par l'aspect de la zone d'avance de la nécrose qui est bien délimitée et déprimée.

4. LE GERME

41. Matériel et méthodes

Environ 300 souches ont été isolées des lésions typiques : nécroses autour des bourgeons dormants, chancres sur rameaux et charpentières, taches sur feuilles et sur fruits, prélevées dans des vergers répartis sur toute la zone d'extension de la maladie (PRUNIER, LUISETTI, GARDAN, 1970).

Les caractères cultureux sont observés sur le milieu L P G A (extrait de levure Difco : 5g., bacto-peptone Difco : 5g., glucose : 10g., agar : 20g., eau distillée : 1 000ml, pH ajusté à 7,2 (RIDE, 1963).

L'utilisation des sources hydrocarbonées est recherchée sur milieu minéral de COHEN-BAZIRE modifié par STANIER, PALLERONI, DOUDOROFF (1966), auquel est ajouté la substance à la concentration de 2 o/oo.

Les phages sont utilisés à la dilution de routine (Routine test dilution des anglosaxons), qui correspond à la dernière dilution du phage concentré, donnant une lyse confluyente avec la souche bactérienne qui a servi à le multiplier. L'épreuve sérologique utilisée est l'agglutination sur lame avec un sérum dilué au 1/20.

42. Résultats

421. Le genre *Pseudomonas*

La 8ème édition du Bergey's manual of determinative bacteriology (1974), classe les bactéries en forme de bâtonnet et de cocci, Gram négatif, aérobies, en 5 familles : Pseudomonadacées, Azotobacteriacées, Rhizobiacées,

Espèces	Réactions utilisées											
	Groupe	Lévane	Oxydase	Pectine	Arginine	Tabac	2 ceto-gluconate	Nitrate Réductase	Saccharose	Gélatine	Aesculine	Tyrosine
Ps. syringae Ps. persicae Ps. mors-prunorum	Ia	+++	---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	+ d
Ps. delphinii	Ib	-	-	-	-	+	-	-	+	+ v	v	-
Ps. viridiflava	II	-	-	+	-	d	-	-	-	+	+	N T
Ps. cichorii	III	-	+	-	-	+	-	d v	-	-	v	d v
Ps. marginalis	IVa	+	+	+	+	-	+ x	+ x v	+ x v	+ v	- x v	d v
Ps. fluorescens	Va	- v	+	+	+	-	- x	-	- x	+ x	-	- v
Ps. aeruginosa	Va	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
Ps. fluorescens	Vb	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-

+ positif; - négatif; +v, -v résultats variables suivant les laboratoires; d résultats variables avec différents isolats; v grande variation dans les résultats dans un laboratoire ou d'un laboratoire à l'autre; x une exception; N T non testé.

TABEAU 4. SCHEMA DE DETERMINATION DES *PSEUDOMONAS* FLUORESCENTS PHYTOPATHOGENES (D'après LELLIOTT, BILLING et HAYWARD, 1966)

Méthylomonadacées et Halobacteriacées. La famille des Pseudomonadacées comprend 4 genres : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Zoogloea* et *Gluconobacter*. Les germes appartenant au genre *Pseudomonas* se présentent sous forme de cellule unique en bâtonnet droit ou incurvé, jamais en hélice, de dimensions 0,5-1 μm sur 1,5-4 μm , mobiles par flagelles polaires (monotriche ou multitriche) Gram négatif, chimio-organotrophe (métabolisme jamais fermentatif), aérobies strictes sauf les espèces qui utilisent la dénitrification comme moyen de respiration anaérobie, catalase positive, ayant un G + C % compris entre 58 et 70; quelques espèces sont chimiolithotrophes et utilisent l'hydrogène et l'oxyde de carbone comme source d'énergie, d'autres sont dénitrifiantes ^{besoin/}utilisant les nitrates comme accepteur final d'électrons alors que la majorité ont d'oxygène moléculaire. L'espèce type de cette famille est *Pseudomonas aeruginosa* (SCHROETER) MIGULA et 29 espèces seulement sont retenues.

Les *Pseudomonas* phytopathogènes se classent dans la section I (espèces n'accumulant pas de poly β hydroxybutyrate et produisant un pigment fluorescent aux U.V. extracellulaire) dont les espèces types sont *Ps. syringae* et *Ps. cichorii* et dans la section II (espèces accumulant du poly β hydroxybutyrate dans leur cellule) comme *Ps. caryophylli*.

La simplification apportée par DOUDOROFF et PALLERONI dans la 8ème édition du Bergey's manual, est intéressante dans l'esprit, mais ne peut satisfaire entièrement le phytopathologiste; des études complémentaires sur les propriétés biochimiques, les caractères immunologiques et lysotypiques et la spécificité parasitaire des *Pseudomonas* sont indispensables pour une meilleure connaissance des espèces phytopathogènes.

Les bactéries responsables des maladies des arbres fruitiers appartiennent au groupe des *Pseudomonas* de la section I, produisant un pigment soluble jaune-vert, fluorescent aux U V. Dans la pratique courante, le schéma de LELLIOTT, BILLING et HAYWARD (1966), (tableau 4), permet de différencier facilement les *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes. La pectinolyse est recherchée par le gel de pectate de calcium (PRUNIER, KAISER, 1964). Aux trois premiers groupes appartiennent les espèces dont le pouvoir pathogène est indiscutable (test tabac positif) alors que dans les groupes IV et V on rencontre des espèces saprophytes ou épiphytes plus ou moins bien définies, dont le diagnostic n'est pas toujours facile. A l'aide de trois critères biochimiques : production de levane, d'enzymes pectinolytiques et présence ou non de cytochrome C oxydase, on aboutit facilement au 5 groupes; les espèces de chaque groupe sont ensuite différenciées à l'aide des tests secondaires.

TABLEAU 5. DIAGNOSTIC DIFFERENTIEL DES *PSEUDOMONAS* DES ARBRES FRUITIERS

Espèces Réactions utilisées	<i>Ps. syringae</i>	<i>Ps. mors-prunorum</i>	<i>Ps. persicae</i>
Gélatine	+	-	-
Aesculine	+	-	-
Tyrosine	- V	+	d
Leucine	+	-	-
Lactate	d	-	-
D tartrate	-	+	-
L tartrate	d	-	d
KING B	+	+	-

d : caractère variable selon les souches

- V : majorité des souches négatives.

422. Détermination de l'espèce *Ps. persicae*

Ps. persicae se présente sous la forme d'un bâtonnet de 3-4 μm x 0,5 μm non sporulé, Gram négatif pourvu de 1 à 4 flagelles polaires. Le type respiratoire est strictement aérobie et le glucose est dégradé par voie de métabolisme oxydative. Non fluorescent sur milieu de KING B, ce germe produit un pigment diffusible fluorescent aux U.V. sur un nouveau milieu (LUISETTI, PRUNIER, GARDAN, 1972). De plus il ne possède pas de cytochrome C oxydase et utilise le citrate de sodium comme unique source de carbone.

Les caractères de cette bactérie correspondent bien à la définition du genre *PSEUDOMONAS*, et la classe dans le groupe Ia des *Pseudomonas* fluorescents phytopathogènes de LELLIOTT, BILLING et HAYWARD (1966). L'ensemble de ses caractères biochimiques (tableau 4 et tableau 5) la rapproche de *Ps. syringae* et de *Ps. mors-prunorum*, bactéries fréquemment rencontrées sur les arbres fruitiers.

Dans la pratique courante le diagnostic différentiel se pose surtout avec *Ps. syringae* qui peut se trouver dans des lésions de pousses herbacées et sur les feuilles, mais pas avec *Ps. mors-prunorum* qui n'a encore jamais été rencontré sur Pêcher en France. En plus de sa vitesse de croissance assez lente et de la morphologie des colonies, ce germe peut facilement se différencier de *Ps. mors-prunorum* et ^{de} *Ps. syringae* à l'aide de 8 critères biochimiques : présence d'une gélatinase, d'une β glucosidase et d'une tyrosinase, production de pigment fluorescent sur milieu de KING B et utilisation comme seule source de carbone de la leucine, du lactate et du D et L tartrate (tableau 5). Un diagnostic rapide peut se faire en utilisant les réactions de KING B à la gélatine et à la leucine.

La lysotypie peut être d'une aide précieuse dans l'identification des bactéries. L'utilisation de 9 phages isolés par RAT permet de différencier *Ps. persicae* des *Pseudomonas* des groupes I à V de LELLIOTT, BILLING, HAYWARD (1966). Le tableau 6, montre que chez *Ps. persicae*, deux lysotypes dominants sont déterminés par la sensibilité au phage 9. L'existence de plusieurs lysotypes de *Ps. persicae*, est un obstacle à l'utilisation des phages, comme moyen de diagnostic de routine.

Trois souches de *Ps. syringae* isolées de la surface des feuilles de Pêcher, ont le même lysotype que *Ps. persicae*; les autres souches de *Ps. syringae*, de *Ps. mors-prunorum* et de *Ps. viridiflava* se différencient facilement de *Ps. persicae* (tableau 6). L'intérêt de la lysotypie est évident, mais les phages ne peuvent être utilisés seuls, dans le diagnostic de routine de *Ps. persicae*, en effet, certaines souches de *Ps. persicae* ont un lysotype aberrant ou le même lysotype que certaines souches de *Ps. syringae*.

Cette technique pourrait cependant être améliorée par la recherche de bactériophages plus spécifiques.

L'utilisation d'un sérum (obtenu avec des antigènes chauffés), dilué au 1/20, en agglutination sur lame, donne des réactions croisées avec les autres *Pseudomonas* des arbres fruitiers. Une étude approfondie sur les relations sérologiques entre *Ps. persicae*, *Ps. viridiflava*, *Ps. syringae* et *Ps. mors-prunorum*, est actuellement en cours et doit permettre d'obtenir des sérums spécifiques utilisables dans le diagnostic sérologique par immunofluorescence, par agglutination sur lame ou par précipitation en tube.

5. LE POUVOIR PATHOGENE DE PS. PERSICAE

Avant de pouvoir affirmer qu'une bactérie est phytopathogène il est nécessaire de reproduire expérimentalement, par inoculation de la bactérie obtenue en culture pure, tous les symptômes observés dans la nature; c'est une des règles

importante du principe de KOCH qu'il était indispensable de vérifier pour cette nouvelle bactérie.

Un programme d'inoculation de la bactérie à des jeunes arbres d'un an, ayant pour but de reproduire intégralement tous les symptômes, d'étudier les variations de sensibilité des tissus de l'arbre en fonction de la date d'inoculation (octobre à février) et de la dose d'inoculum, a été conduit en 1968-1969 en Ardèche et en 1969-1970 à Versailles. Ce travail a fait l'objet de deux longs articles dont nous ne retiendrons que les éléments indispensables à la cohésion des recherches effectuées sur cette maladie (PRUNIER, LUISETTI, GARDAN, 1974; LUISETTI, GARDAN, PRUNIER, 1974). Une première expérimentation conduite en 1967-1968 sur des arbres naturellement contaminés n'avait donné que des résultats partiels (VIGOUROUX, 1968).

51. Matériel et méthodes

La bactérie est inoculée en Ardèche sur des rameaux mixtes des arbres d'un an, de la variété J.H. Hale, tous les 15 jours d'octobre à février. Chacun des 4 arbres inoculés reçoit 32 inoculations (16 sur plaies pétiolaires fraîches ou anciennes après la chute des feuilles, et 16 sur blessures (incisions faites à l'aide d'un scalpel). L'inoculum est constitué d'une culture en phase exponentielle concentrée : souche I.N.R.A. 720-21.

Les nécroses sont mesurées tous les 15 jours à chaque série d'inoculation, ce qui a permis de suivre individuellement l'évolution de la longueur de chaque inoculation. Les nécroses sont réparties en classe suivant leur longueur :

Classe	Longueur	Caractéristiques
0	0 - 5 mm	. Réponse négative
1	6 - 25 mm	. Réaction atypique : apparition rapide en moins de 15 jours, non évolutive.
2	> 25 mm	. Réactions d'infection : apparition lente au bout de 1 à 2 mois, évolutive.

L'ajustement à une droite des données transformées (transformation logarithmique à base 10) permet de tracer les courbes d'évolution de la longueur moyenne des réactions d'infection.

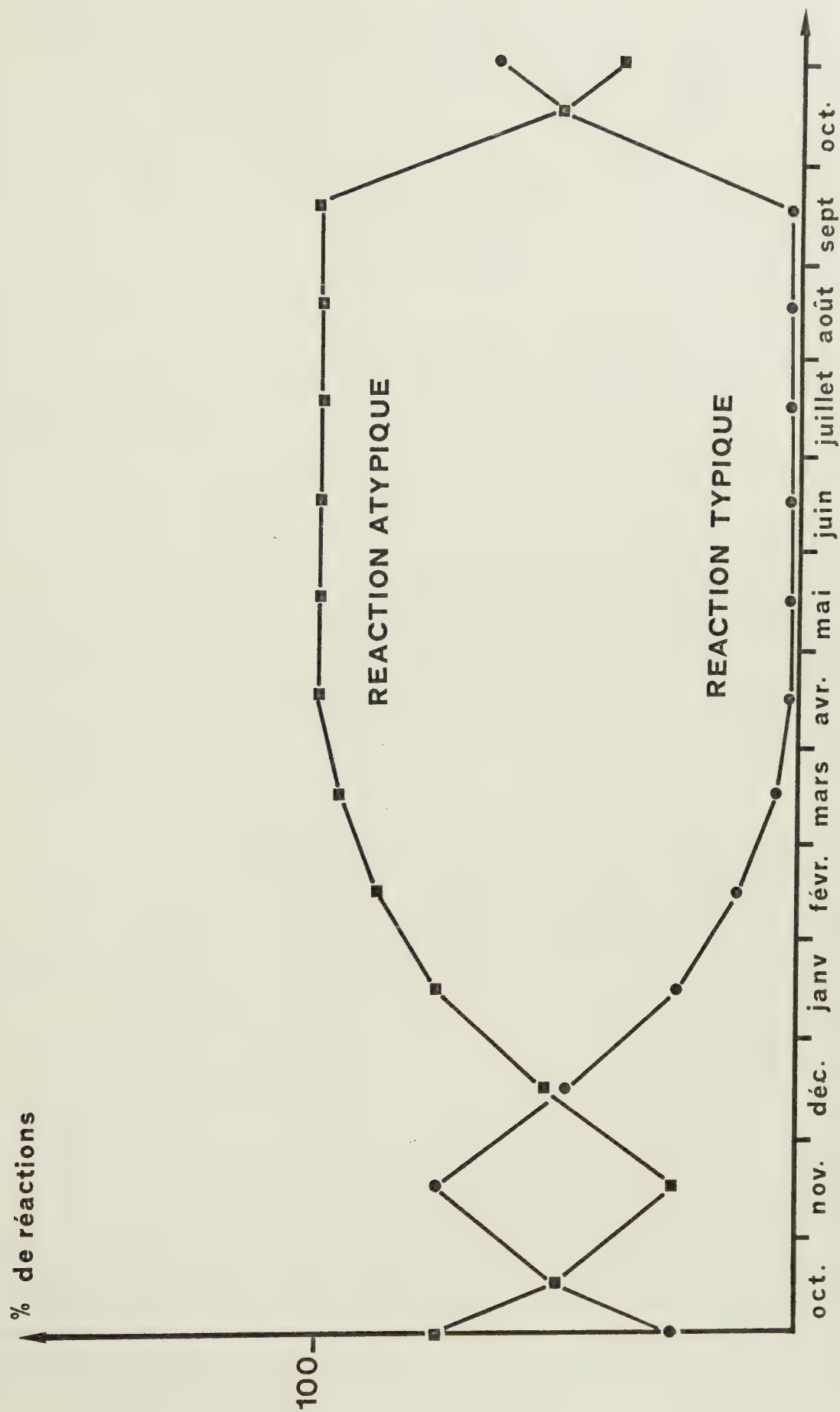


Fig. 3. REPARTITION DANS L'ANNEE DU POURCENTAGE DE REACTIONS D'INFECTION (REACTIONS TYPIQUES) ET DE REACTIONS ATYPIQUES.

Si l'on désigne par :

y : la valeur de longueur moyenne en mm de la nécrose à l'instant t.

a : l'ordonnée de l'asymptote de la sigmoïde (valeur trouvée à la dernière lecture augmentée d'une unité).

c : coefficient angulaire de la droite.

yo : l'ordonnée à l'origine de la droite.

La variable transformée ($\frac{y}{a-y}$) est une fonction linéaire du temps ty : $\log \left(\frac{y}{a-y} \right) = ct + yo$.

Nous avons choisi de représenter graphiquement les courbes obtenues par ajustement statistique à une droite sur la variable transformée ; leur équation générale est :

$$y = a \frac{10^{ct + yo}}{1 + 10^{ct + yo}}$$

Les caractéristiques de cette courbe sont :

. le point d'inflexion pour la valeur $t = \frac{yo}{c}$, l'abscisse de ce point correspond au temps nécessaire pour obtenir 50 % (t 50 %) de la longueur finale de la nécrose ($y = \frac{a}{2}$).

. La vitesse maximale qui est la valeur de la vitesse au point d'inflexion : $V = \frac{ac}{4}$.

52. Résultats

521. Réponse à un inoculum élevé (Ardèche 1968-1969)

L'inoculation de la bactérie à des rameaux de Pêcher sur des blessures, pendant toute une année conduit à trois types de réponses :

- . réaction nulle
- . réaction atypique qui apparaît rapidement mais dont l'évolution est limitée dans le temps
- . réaction typique ou réaction d'infection lente à apparaître mais évolutive .

5211. Variation du pourcentage des réactions obtenues

La fig. 3 montre que la proportion relative des réactions typiques et atypiques varie au cours de l'année suivant les stades phénologiques de l'arbre : les réactions typiques ne surviennent que d'octobre à février alors que les réactions atypiques sont obtenues à 100 % pendant la période végétative et en plus ou moins grand nombre pendant la chute des feuilles et le repos de la végétation.

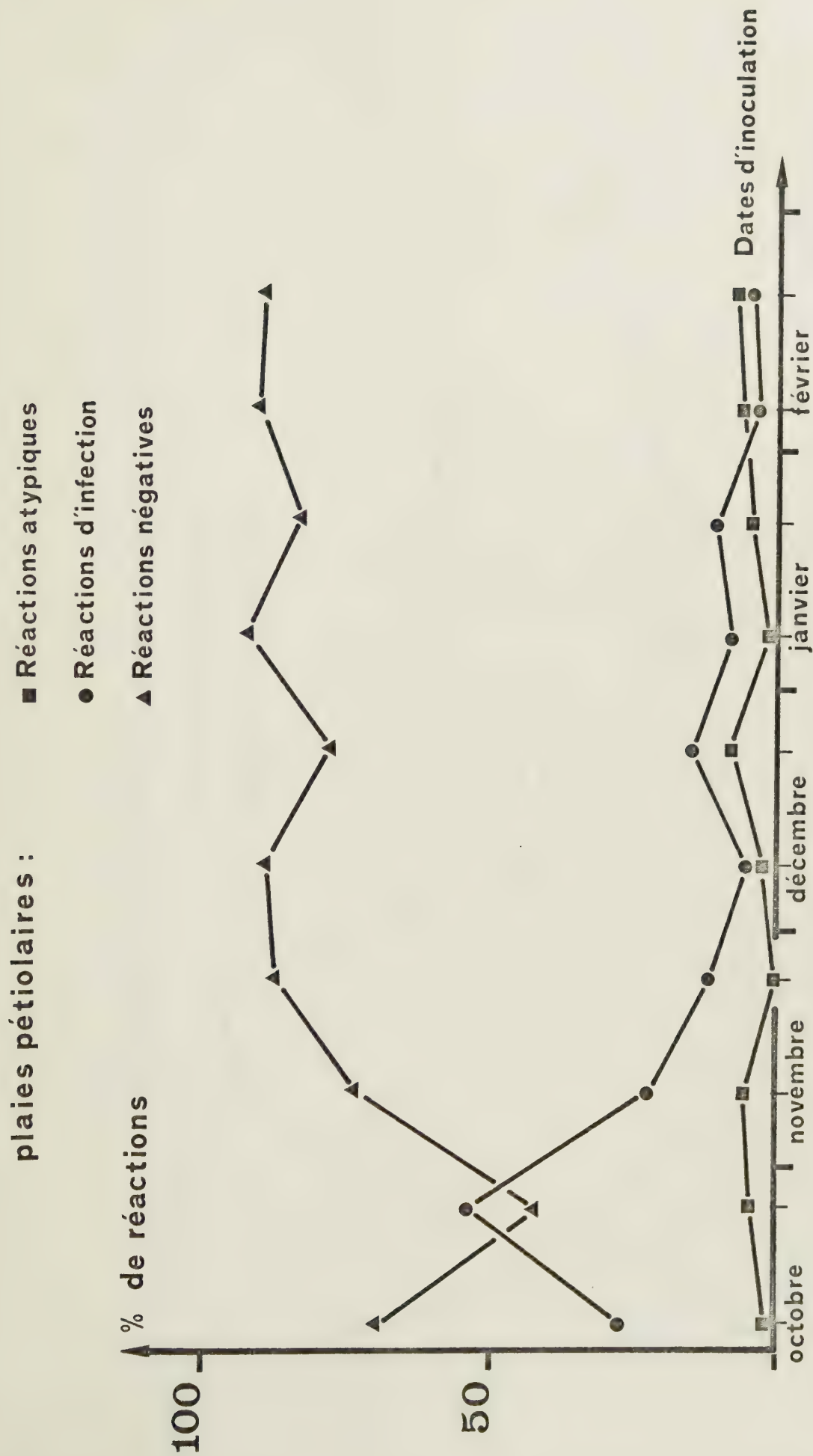


Fig. 4. POURCENTAGE DES REACTIONS D'INFECTION, REACTIONS ATYPIQUES ET REACTIONS NEGATIVES,

OBTENUES APRES INOCULATION DE LA BACTERIE, EN AUTOMNE ET EN HIVER SUR PLAIES PETIOLAIRES.

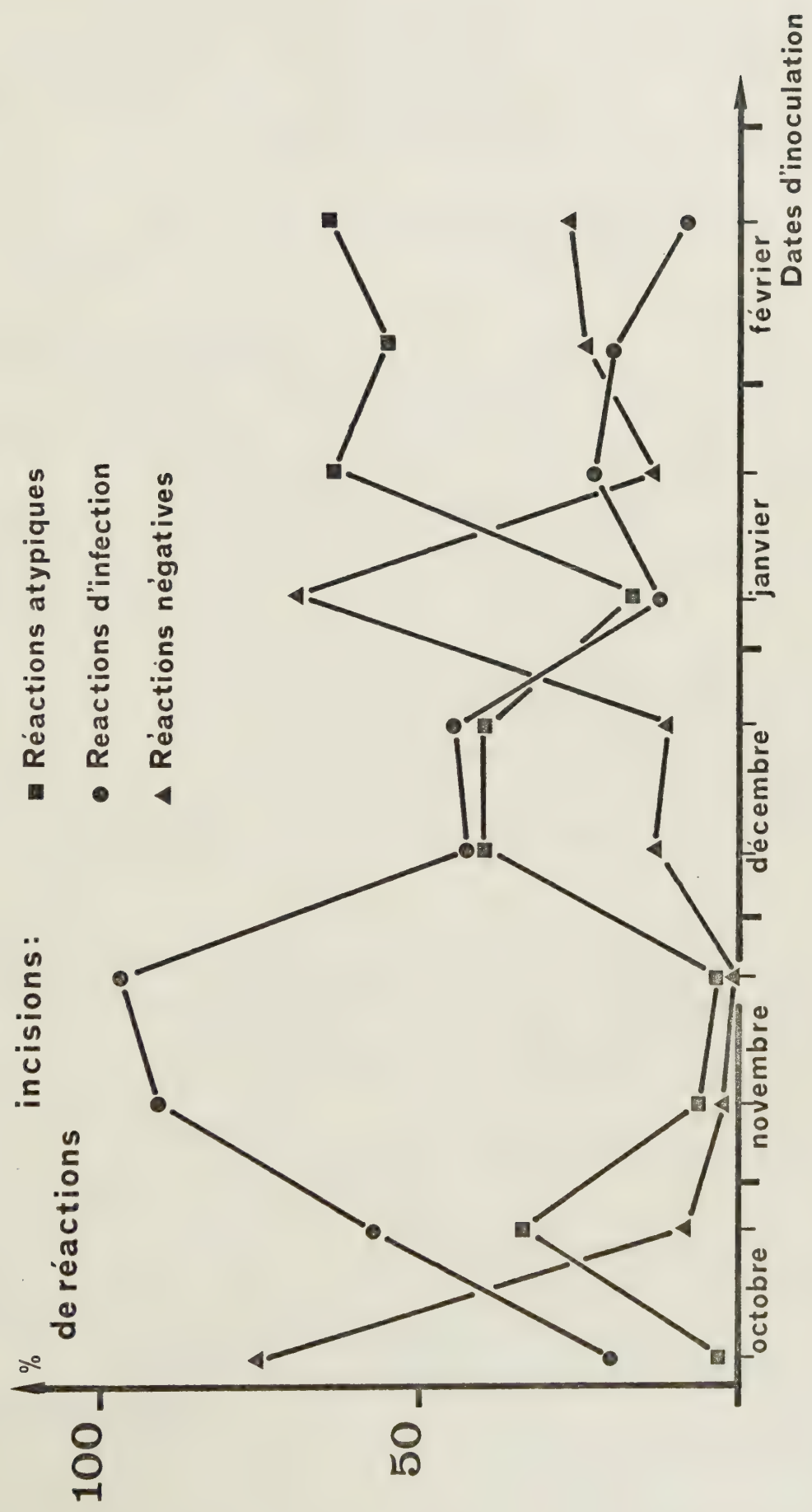


Fig. 5. POURCENTAGE DE REACTIONS D'INFECTION, REACTIONS ATYPIQUES ET REACTIONS NEGATIVES, OBTENUES APRES INOCULATION DE LA BACTERIE EN AUTOMNE ET EN HIVER, SUR INCISIONS (BLESSURES).

D'octobre à février, le pourcentage de chaque type de réactions varie en fonction du mode et de la date d'inoculation :

+ inoculation sur plaie pétioleaire : fig. 4

. le pourcentage de réactions d'infection est maximum (54) pour l'inoculation du 24-10 pendant la chute des feuilles et faible ensuite (11 à 23) après la cicatrisation des plaies pétioleaires,

. le pourcentage de réactions limitées est constamment inférieur à 10,

. les réponses négatives sont toujours nombreuses et constituent la classe majoritaire.

+ inoculation sur blessure : fig. 5

. le pourcentage de réactions d'infection est important en octobre, novembre et décembre (avec un maximum de 98) et plus faible ensuite (de 8 à 23).

. le nombre des réactions atypiques est faible en octobre et novembre, moyen en décembre et plus important ensuite.

. le pourcentage de réactions négatives est en moyenne très faible sauf pour deux séries en octobre et en janvier.

5212. Variation de la longueur moyenne des nécroses

Le tableau 7 donne les éléments remarquables des courbes d'évolution de la longueur moyenne des nécroses pour chaque série d'inoculation. La courbe d'évolution maximale de la longueur d'une nécrose, est celle qui donne la longueur finale la plus grande, dans le délai le plus court (t 50 % minimum et vitesse au point d'inflexion maximale).

+ inoculation sur plaie pétioleaire : fig. 6 - tableau 7

On peut distinguer différents modes d'évolution, en particulier sur la base du temps de développement des réactions d'infection ou mieux du temps nécessaire pour obtenir 50 % de la longueur de la nécrose (t 50 %) et de la longueur finale moyenne :

. La série 2 (P2) présente l'évolution maximale : valeur finale des nécroses 182 mm, t 50 % de 69 jours.

. Les séries 1, 3, 4 (P1, P3, P4) aboutissent à des longueurs de l'ordre de 120 mm mais leur développement est plus ou moins décalé dans le temps puisque le t 50 % est respectivement de 114, 84 et 69.

. Les séries 6 et 8 (P6, P8) donnent des longueurs de nécrose plus faibles (87 et 65).

Série	Date	Incision (blessure)				Plaie pétiolaire			
		% de réaction d'infection	Abscisse du point d'inflexion t 50%	Longueur maximale (en mm)	Vitesse maximale (1)	% de réaction d'infection	Abscisse du point d'inflexion t 50%	Longueur maximale (en mm)	Vitesse maximale (1)
1	10.10.68	20	117	129,7	46,2	28	114	120,9	44,3
2	24.10.68	58	72	176,9	116,4	54	69	182,3	120,4
3	07.11.68	92	69	151,1	82,2	23	84	125,9	58,1
4	21.11.68	98	64,5	151,9	97,3	12	69	124,4	72,8
5	05.12.68	43	94,5	63,4	26,3				
6	19.12.68	45	69	74,0	44,9	15	79,5	87,6	37,1
7	03.01.69	13	72	42,2	21,8	8	51	128,2	32,7
8	16.01.69	23	63	73,3	54,2				
9	30.01.69	20	51	52,4	44,3	11	57	65,9	41,5
10	13.02.69	8	43,5	68,2	69,3				

(1) est exprimée en mm par intervalle de 15 jours, au point d'inflexion de la courbe : $v = \frac{ac}{4}$

TABLEAU 7. ELEMENTS REMARQUABLES DES COURBES D'EVOLUTION DE LA LONGUEUR MOYENNE DES NECROSES

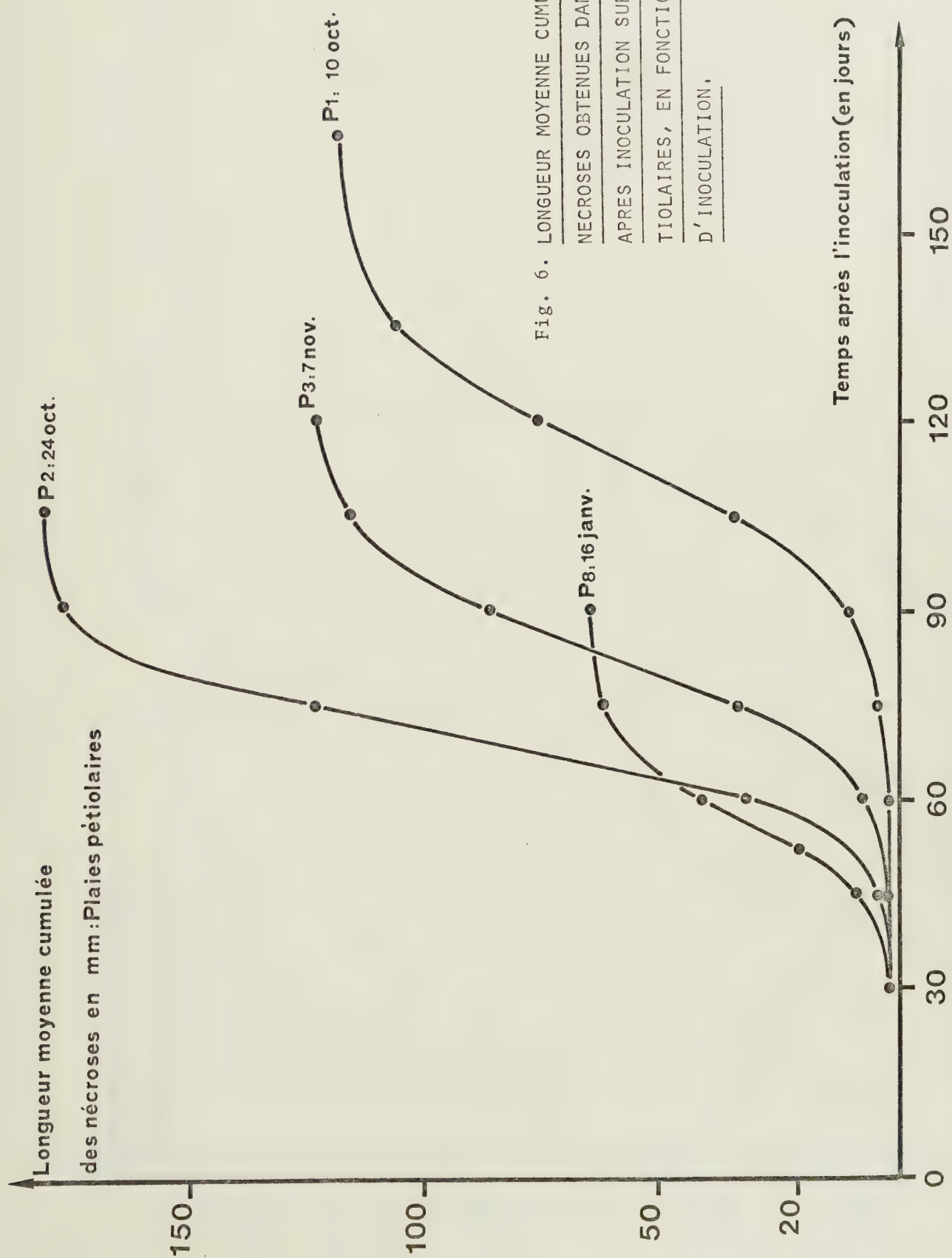


Fig. 6. LONGUEUR MOYENNE CUMULEE DES
NECROSES OBTENUES DANS LE TEMPS
APRES INOCULATION SUR PLAIES PE-
TIOLAIRES, EN FONCTION DE LA DATE
D'INOCULATION.

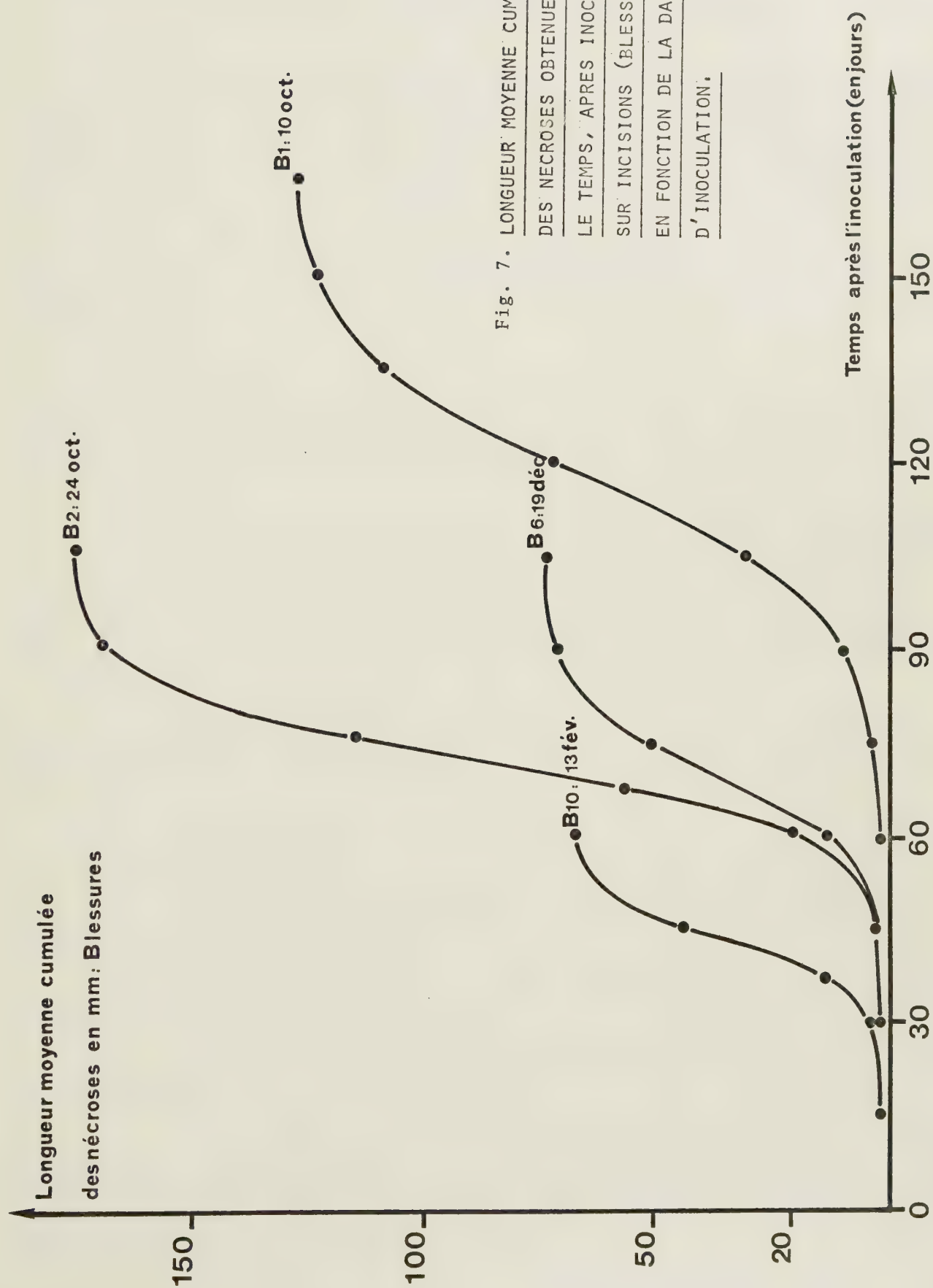


Fig. 7. LONGUEUR MOYENNE CUMULEE
DES NECROSES OBTENUES DANS
LE TEMPS, APRES INOCULATION
SUR INCISIONS (BLESSURES),
EN FONCTION DE LA DATE
D'INOCULATION.

+ inoculation sur blessure : fig. 7 - tableau 7

Le classement des courbes d'évolution de la longueur des nécroses est bien net :

. Les séries 2, 3, 4 (B2, B3, B4) ont des caractéristiques voisines : vitesse maximale élevée de 82 à 116 et longueur finale de 151 et 176 mm. La courbe correspondant à la série 1 (B1) a une allure voisine mais avec une vitesse d'évolution plus lente, le t 50 % est de 98 jours alors qu'il n'est que de 75 jours en moyenne pour les séries 2, 3 et 4.

. Pour les séries 5, 6, 7, 8, 9, 10 (B5, B6, B7, B8, B9, B10) les longueurs finales de nécrose sont limitées entre 40 et 80 mm et le t 50 % varie de 43 à 95 jours.

Il est à noter que le pourcentage des réactions obtenues et l'évolution de la longueur moyenne des nécroses donnent des résultats convergents et peuvent servir à l'appréciation de la sensibilité du Pêcher à *Ps. persicae*.

522. Effet de la dilution de l'inoculum (Versailles 1969-1970)

L'apport d'un inoculum dilué de 10^9 à 10^4 bactéries par ml, sur les blessures entraîne une diminution de la fréquence des réactions typiques et atypiques, de la longueur finale des nécroses et une augmentation plus ou moins marquée du temps d'incubation.

Sur les plaies pétiolaires l'effet dose d'inoculum n'amène qu'une augmentation du temps d'incubation.

53. Conclusions

Les recherches sur le pouvoir pathogène de *Ps. persicae* ont permis :

. de reproduire intégralement tous les symptômes observés dans la nature par inoculation de la bactérie à des rameaux mixtes,

. de confirmer le rôle des plaies pétiolaires comme voie d'entrée de la bactérie dans les tissus à l'automne,

. de prouver que 50 bactéries mises en contact avec les tissus, suffisent à déclencher le processus infectieux,

. de montrer que les tissus du Pêcher ne sont sensibles à la bactérie qu'en octobre, décembre, et janvier ce qui est important pour normaliser le test du pouvoir pathogène de cette bactérie soit pour vérifier la virulence des souches soit pour étudier la sensibilité variétale.

Il n'est pas possible d'expliquer, pour le moment, le passage de l'état de résistance à l'état de sensibilité des tissus de Pêcher à l'automne et l'inverse à la reprise de la végétation. DOWLER et PETERSEN (1966) ont montré que dans les rameaux de Pêcher, le taux d'amidon diminue d'octobre à février, alors ^{que} le taux de sucres solubles varie de façon inverse pendant la même période; tous les arbres inoculés en octobre meurent alors que ceux inoculés en février sont vivants, il semble donc y avoir une relation entre l'évolution du taux d'amidon et des sucres solubles dans les rameaux de Pêcher et la sensibilité des tissus de l'arbre mais l'explication du passage de l'état sensible à l'état résistant du Pêcher est sans doute liée à des phénomènes physiologiques beaucoup plus complexes.

6. SENSIBILITE VARIETALE

La variété J.H. Hale, la plus cultivée sur le Plateau de Tournon, est très sensible à la maladie; il était donc important de connaître la sensibilité des autres variétés au dépérissement bactérien du Pêcher. L'inoculation par blessure, des rameaux mixtes la première année et des charpentières la deuxième année pendant la période de sensibilité maximale des tissus de Pêcher a permis d'établir l'échelle de sensibilité de différentes variétés (GARDAN, LUISETTI, PRUNIER, 1971; VIGOUROUX 1972).

Les 80 variétés et les porte-greffes issus de semis de noyaux de Pêcher sont sensibles à *Ps. persicae* mais à des degrés divers; les autres espèces de *Prunus* sont résistantes.

TABLEAU 8. ECHELLE DE SENSIBILITE A *PS.PERSICAE* DES VARIETES DE PECHER CULTIVEES EN FRANCE

Degré de sensibilité	Très sensible	Moyennement sensible	peu sensible
Variétés de Pêches			
A chair jaune	J.H.Hale, Blake	Fairhaven, Cardinal Southland	Dixired, Redhaven Redskin
A chair blanche	Arnaud III, Genadix 4	Springtime, Guilloux élégante	Michellini, Amsden, Robin
Pavies	Shasta, Dixon	Babygold 9, Suncling	
Nectarines et Brugnons	Nectared 8, Morton	Nectared 9, Early Sungrand	Nectared 4, Nectaheart

Une analyse basée sur la longueur des nécroses obtenues sur les rameaux mixtes la première année et la vigueur des arbres après inoculation des charpentières, l'année suivante, a permis d'établir trois groupes de sensibilité des différentes variétés de Pêcher. Le tableau 8 donne quelques exemples de variétés correspondant à chaque classe de sensibilité. La variété Redskin à chair jaune, est peu sensible et a des caractéristiques culturales proches de J.H. Hale (productivité, maturité tardive), elle pourrait donc être à la base de la replantation des vergers de Pêcher sur le plateau de Tournon.

Les deux critères utilisés pour apprécier la sensibilité des différentes variétés, ne donnent pas toujours un classement strictement identique. L'implantation homogène de la bactérie sur les feuilles à l'automne, puis le comptage du nombre de plaies pétiolaires contaminées et la mesure de la longueur finale des nécroses obtenues, devraient compléter nos connaissances sur la sensibilité variétale et peut-être faire la relation avec certaines caractéristiques propres à chaque variété comme l'étalement de la chute des feuilles et l'aptitude à laisser pénétrer l'inoculum bactérien par les cicatrices foliaires.

7. CONCLUSION

Cette nouvelle bactérie se classe bien parmi les *Pseudomonas* fluorescents du groupe Ia de LELLIOTT et al (1966). Ses propriétés biochimiques la rapproche de *Ps. syringae* et surtout de *Ps. mors-prunorum*, de plus, les symptômes qu'elle provoque sur Pêcher rappellent beaucoup ceux du chancre bactérien du Cerisier. Pour ces raisons cette bactérie a d'abord été dénommée *Ps. mors-prunorum* f. sp. *persicae*; il serait maintenant préférable de l'appeler *Ps. persicae* car il a été montré qu'elle était strictement inféodée à l'espèce *Prunus persica*.

Le dépérissement bactérien du Pêcher en France est bien imputable à *Ps. persicae* puisque les règles du principe de KOCH ont été vérifiées pour cette bactérie : isolement de lésions caractéristiques, identification et caractérisation et reproduction intégrale des symptômes.

C'est une nouvelle maladie du Pêcher, puisque les symptômes et l'agent pathogène n'ont été observés pour la première fois qu'en 1967. On peut donc se demander d'où vient la bactérie.

Il ne peut s'agir d'une introduction de pays étrangers, puisque les dépérissements bactériens du Pêcher, signalés dans le monde sont dus à un autre germe : *Ps. syringae*. Comme nous le verrons dans le deuxième chapitre, d'autres *Pseudomonas* fluorescents comme *Ps. viridiflava* et *Ps. syringae* sont fréquemment rencontrés sur la surface des feuilles. Dans les populations de *Ps. syringae*,

il est possible de mettre en évidence des variations portant sur les caractères biochimiques (fluorescence sur milieu de KING B, présence de β glucosidase et de gélatinase etc...) et sur les propriétés de surface (sensibilité à certains phages); un de ces variants de *Ps. syringae* qui est occasionnellement pathogène sur les pousses herbacées et les feuilles, a très bien pu s'adapter au Pêcher et devenir *Ps. persicae*. Ce phénomène est sans doute apparu localement puisqu'il est possible de suivre la progression de la maladie à partir des premiers foyers connus.

CHAPITRE II

VARIATIONS DES POPULATIONS DE *PS. PERSICAE* ET DES AUTRES BACTERIES

SUR LA SURFACE DES FEUILLES ET DES FRUITS.

La localisation des nécroses autour des bourgeons dormants, la sensibilité des tissus pendant la chute des feuilles et la nature même du germe, ont permis de faire assez vite un rapprochement entre cette nouvelle maladie du Pêcher et le chancre bactérien du Cerisier (CROSSE, 1955). Il fallait entre autre trouver l'origine de l'inoculum responsable de la contamination des plaies pétiolaires. Nous avons donc mis au point une méthode permettant de montrer la présence de la bactérie sur les feuilles, les fleurs et les fruits et d'étudier ses variations dans le temps (GARDAN, LUISETTI, PRUNIER, 1972).

1. MISE AU POINT DE LA METHODE

La mise en évidence des bactéries présentes sur les feuilles peut se faire directement soit par culture après replique de la feuille sur milieu gélosé, soit par marquage en immunofluorescence des empreintes de parties de feuille sur collodion. Ces deux méthodes présentent l'avantage de localiser les germes sur la feuille et l'inconvénient de n'être pas facilement quantifiables. Par contre, une simple agitation des feuilles dans l'eau stérile met en suspension les bactéries et la mise en culture sur milieu gélosé convenable des dilutions de ce liquide permet de déterminer le nombre de bactéries.

11. Les travaux de CROSSE sur *Ps. mors-prunorum*

En 1959, CROSSE a publié un article sur la mise au point d'une méthode permettant d'évaluer le potentiel d'inoculum de *Ps. mors-prunorum* sur les feuilles de Cerisier. Un échantillon de 192 feuilles est agité à la température du laboratoire pendant 4 heures dans de l'eau stérile additionnée de dioctylsulfosuccinate de sodium à 0,01 %; un volume donné de dilutions du liquide de suspension est étalé en boîte de Pétri sur milieu gélosé additionné de cristal violet (1 : 50 000) 80 à 90 % des bactéries présentes sur les feuilles, sont ainsi mises en culture et comptées.

Afin d'évaluer les populations de *Ps. persicae* présentes sur les feuilles de Pêcher, nous avons mis au point une méthode adaptée de celle utilisée par CROSSE.

12. Culture de *Ps. persicae*

Une goutte calibrée à 0,05 ml des dilutions au 1/10 (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000) du milieu de lavage, est étalée sur LPGA en boîte de Pétri à raison de cinq répétitions par dilution.

La lecture d'une dilution est faite après 65 heures d'incubation à 25°C, sur les boîtes contenant 50 à 150 colonies isolées. *Ps. persicae* donne des colonies caractéristiques de 1 à 2 mm de diamètre, de couleur blanc crème,

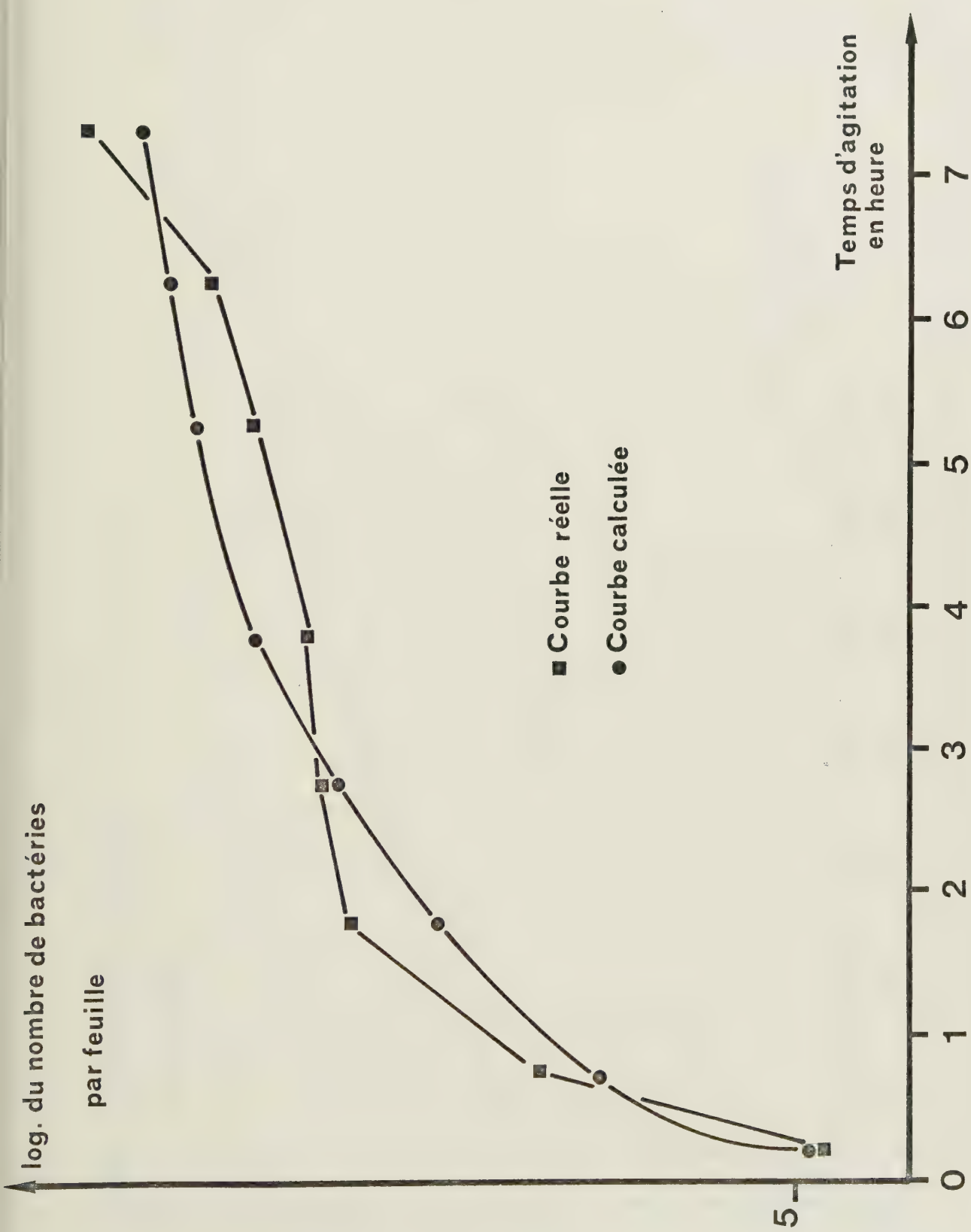


Fig. 8. LOGARITHME DU NOMBRE DE BACTÉRIES PAR FEUILLE EN FONCTION DU TEMPS D'AGITATION :
EXPERIENCE DU 29 MAI.

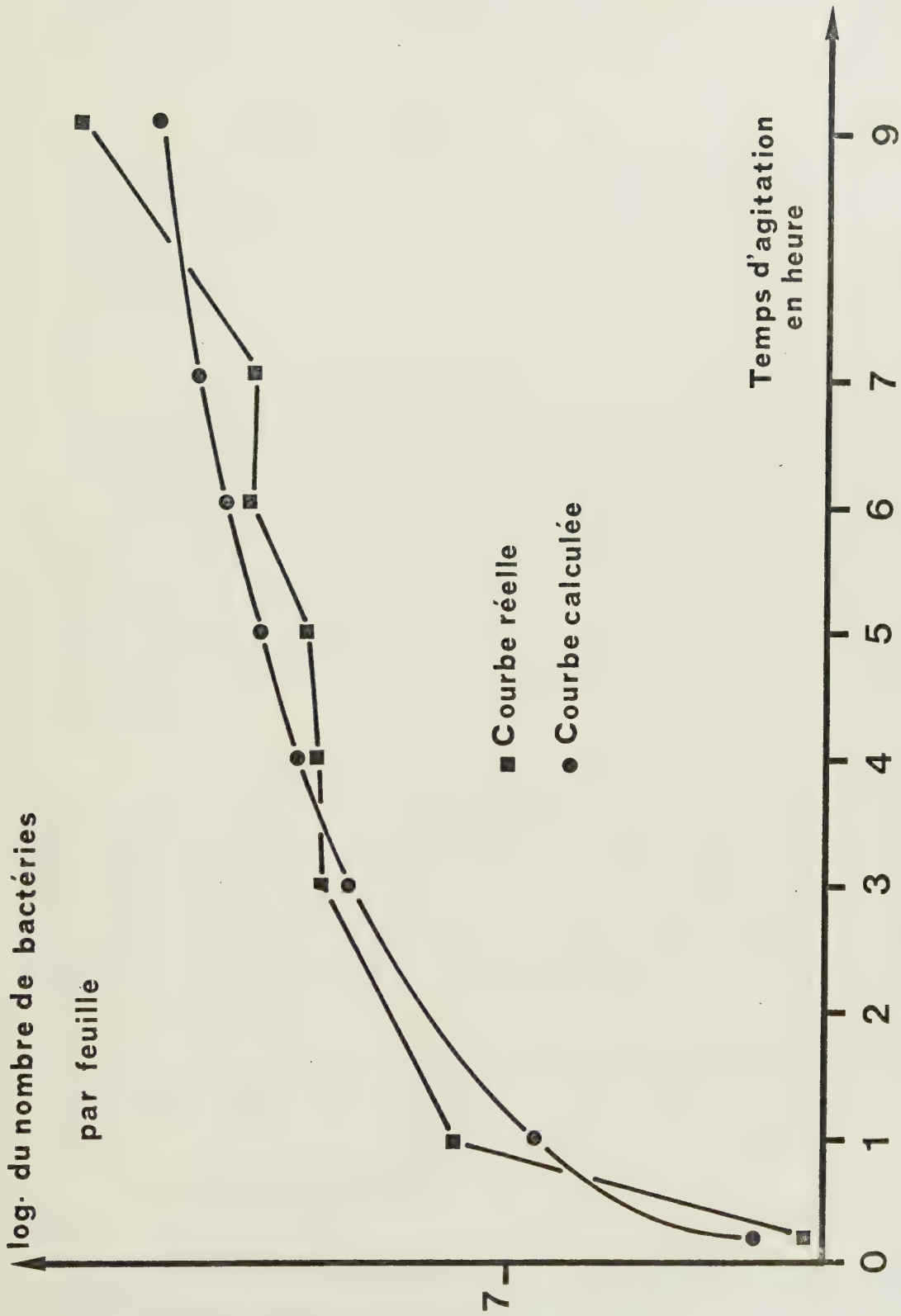


Fig. 9. LOGARITHME DU NOMBRE DE BACTERIES PAR FEUILLE EN FONCTION DU TEMPS D'AGITATION

EXPERIENCE DU 23 OCTOBRE.

translucides, plates et à contour irrégulier et irisé ; ces caractères permettent de le distinguer des autres colonies bactériennes et en particulier de celles des divers *Pseudomonas* fluorescents dont la croissance est plus rapide (colonies de 3 à 4 mm de diamètre). Des prélèvements systématiques pour caractérisation biochimique, ont toujours permis de confirmer le diagnostic visuel. Les résultats sont exprimés en nombre de germes par feuille.

13. Durée d'agitation

L'Erlenmeyer contenant le milieu de lavage (eau stérile plus 1g par litre de bactopeptone) et les feuilles, est agité sur un plan horizontal par un mouvement alternatif d'aller et retour (105 par minute). Des prélèvements de 1/4 d'heure à 9 heures et 24 heures permettent d'apprécier le nombre de germes mis en suspension.

Les courbes réelles des fig. 8 et 9 des expériences du 29.05 et 2.11, illustrent l'évolution du nombre de bactéries mises en suspension pendant une agitation prolongée. Au bout d'un quart d'heure, des quantités importantes de bactéries sont déjà mises en suspension ($8,1.10^4$ et $3,5.10^6$ bactéries par feuille), mais il faut attendre 2 à 3 heures pour atteindre un pallier qui se prolonge jusqu'à 5 et 7 heures, on assiste ensuite à une remontée significative du nombre de bactéries que l'on peut attribuer à une multiplication des germes. Au bout de 24 heures le nombre de *Ps. persicae* atteint $8,9.10^7$ pour l'expérience du 29.5.

A l'aide de la technique statistique de la régression il est possible de calculer, à partir des chiffres réels, une courbe théorique qui correspond à une somme des carrés minimum entre les points réels et cette courbe. L'équation de ces courbes est de la forme : $\log y = Y = k_1 + k_2 X$ ou y est le nombre de bactéries par feuille, k_1 et k_2 des paramètres estimés par la régression et X le temps d'agitation.

Les deux courbes théoriques obtenues représentées sur les fig. 8 et 9 ont respectivement pour équation :

$$Y_1 = 5,291 X^{0,043}$$

$$Y_2 = 5,97 X^{0,030}$$

Ces courbes montrent que la vitesse de mise en suspension est maximale à 1/4 d'heure, diminue très sensiblement à partir de 3 et 4 heures.

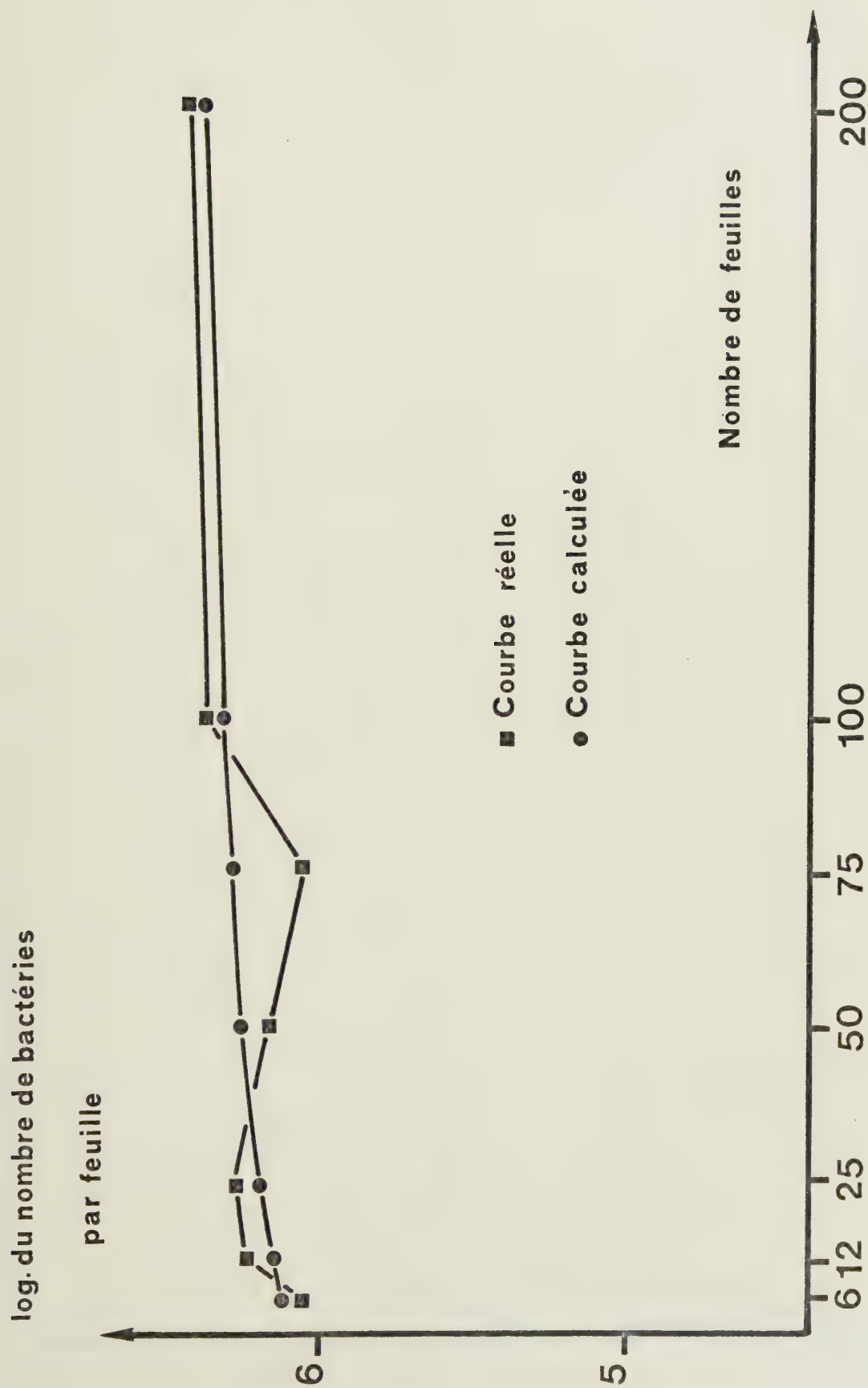


Fig. 10. LOGARITHME DU NOMBRE DE BACTERIES PAR FEUILLE EN FONCTION DE LA GRANDEUR DE L'ECHANTILLON
(6 A 200 FEUILLES).

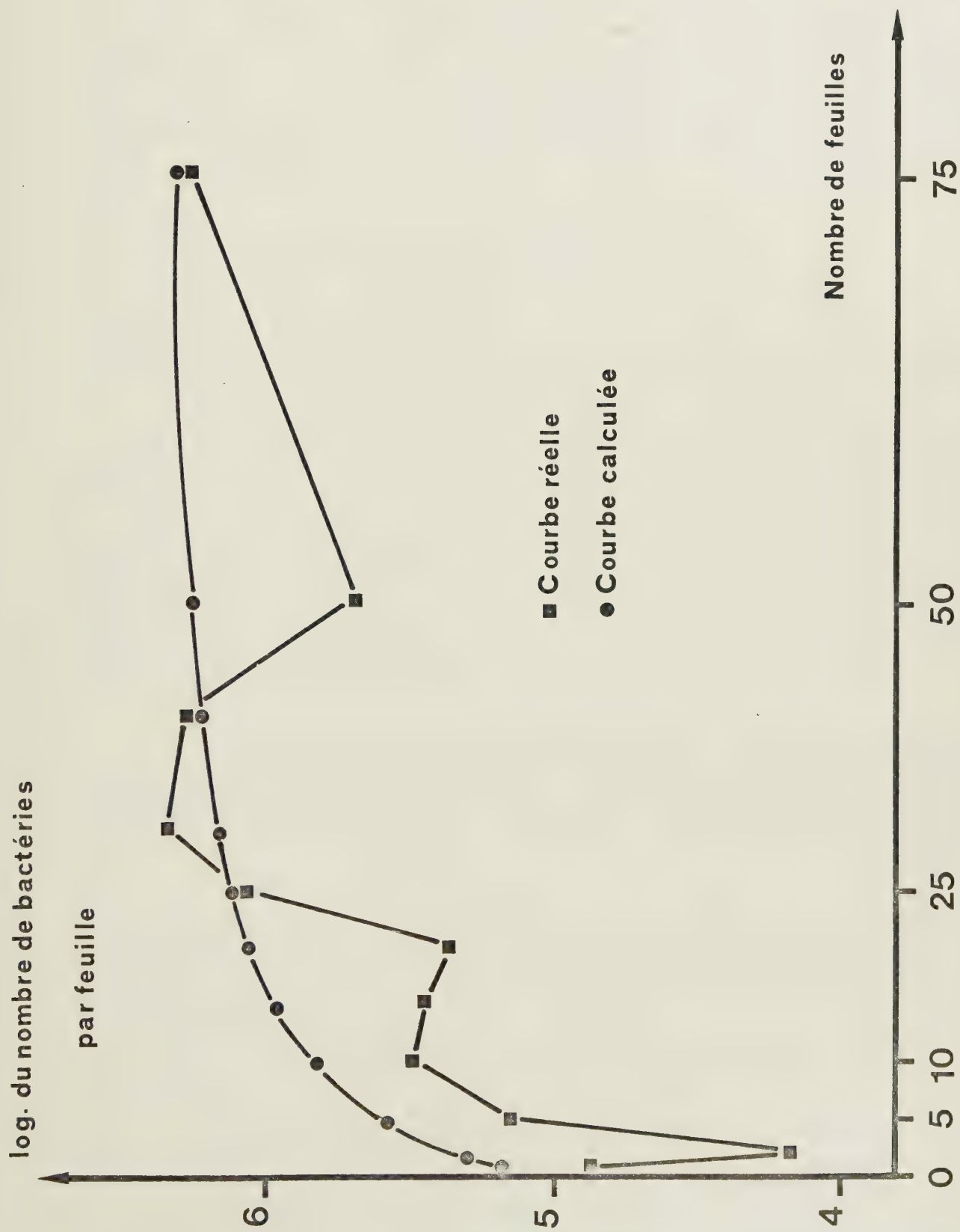


Fig. 11. LOGARITHME DU NOMBRE DE BACTERIES PAR FEUILLE EN FONCTION DE LA GRANDEUR DE L'ECHANTILLON.
(1 A 75 FEUILLES).

La mise en suspension des bactéries peut se faire par broyage des feuilles dans l'eau stérile; cette autre méthode donne des résultats comparables au "lavage" mais présente l'inconvénient de libérer les bactéries présentes dans les tissus, au niveau des taches foliaires par exemple.

D'après ces expériences, on peut estimer que la multiplication des bactéries dans le liquide de lavage est sensible à partir de 6 ou 7 heures, et le temps de lavage peut être fixé entre 3 et 5 heures. Compte-tenu de ces éléments le temps d'agitation a été fixé à 4 heures pour avoir un maximum de germes et éviter leur multiplication.

14. Grandeur de l'échantillon

N'ayant aucune idée de la répartition de *Ps. persicae* sur les feuilles des arbres malades, nous avons cherché à déterminer la grandeur de l'échantillon qui soit représentatif des feuilles présentes sur les arbres analysés.

L'évaluation de la variation du nombre de bactéries par feuille sur des échantillons de grandeur croissante est illustrée sur les fig. 10 (6 à 200 feuilles) et 11 (1 à 75 feuilles). D'après l'expérience de la fig. 11, le nombre de bactéries par feuille peut varier de deux puissances de dix si l'on passe d'un échantillon de 2 feuilles à 25 feuilles, il peut donc exister des variations importantes du nombre de bactéries d'une feuille à l'autre. L'expérience de la fig. 10 montre des variations plus faibles que l'on peut attribuer à une pollution assez homogène des feuilles par ces bactéries.

Une analyse statistique mettant en jeu la régression linéaire montre que la variation du nombre de bactéries par feuille en fonction de la grandeur de l'échantillon, suit une courbe définie par l'équation générale de la forme :

$$\log y = Y = a - \frac{1}{4x + v}$$

ou a est l'asymptote, u et v les paramètres déterminés par la régression linéaire et Y le nombre de bactéries par feuille et x le nombre de feuilles de chaque échantillon.

Les deux courbes théoriques qui ont pour équation :

$$Y_1 = 6,55 - \frac{1}{0,024x + 2,129} \quad (\text{fig. 10})$$

$$Y_2 = 6,45 - \frac{1}{0,094x + 0,693} \quad (\text{fig. 11})$$

nous montrent qu'à partir de 25 feuilles la vitesse des courbes est très faible, et l'augmentation de la grandeur de l'échantillon n'amène pas une augmentation

parallèle du nombre de bactéries par feuille. Un échantillon de 25 feuilles donne donc un bon reflet de la population bactérienne présente sur l'ensemble des feuilles. Pour prendre une bonne marge de sécurité nous avons porté le nombre de feuilles aux environs de 50.

TABEAU 9. MATERIEL VEGETAL AYANT SERVI AUX PRELEVEMENTS REGULIERS DE FEUILLES

Année	N° du verger	Variétés	Age des arbres	Présence antérieure de la maladie	Nombre de feuilles prélevées sur 4 arbres
1969	1	J.H. Hale	3	+	50
	2	Michelini	5	+	50
	3	Cardinal	4	+	50
	4	J.H. Hale	3	-	50
1970	1	J.H. Hale	4	+	64
	2	J.H. Hale	5	+	64
	3	Redhaven	6	+	64
	4	Fairhaven	7	+	64
	5	J.H.Hale	4	-	64
	6	Redhaven	5	-	64

15. Conclusion

Ces quelques expériences nous permettent de fixer la grandeur de l'échantillon à 50 feuilles et la durée d'agitation à 4 heures, à la température du laboratoire. Le prélèvement des feuilles se fait dans des conditions standardisées à 1,50 m du sol et suivant les 4 orientations cardinales.

L'addition de tensio-actif au liquide de lavage, pour faciliter la mise en suspension des bactéries, n'a pas été retenue, car le mannoxol (dioctyl sulfosuccinate de sodium) est bactéricide à la concentration de 500 µg/ml vis à vis de *Ps. syringae* et risquait de l'être à la fois sur *Ps. persicae* et les autres bactéries que nous voulions recenser et caractériser ultérieurement.

Pour des raisons matérielles, l'influence de la température sur le nombre de bactéries obtenues à partir des feuilles n'a pu être étudiée; cependant CROSSE (1959) a bien montré que la température du laboratoire voisine de 20°C donnait le taux de récupération le plus satisfaisant par rapport à la multiplication bactérienne.

Les résultats de comptage peuvent être exprimés par rapport au poids frais, au poids sec, à la surface ou à la feuille. Le poids frais et le poids sec varient beaucoup dans le temps en fonction de l'âge de la feuille et la surface n'est pas facile à mesurer avec précision. Pour des raisons pratiques les résultats sont exprimés en nombre de bactéries par feuille.

Le zéro technique, ou limite de précision de la méthode de numération, est fonction à la fois de la quantité totale de micro-organismes présents sur les feuilles et de la proportion relative de *Ps. persicae*. A titre d'exemple, cette limite inférieure de détection est de 40 bactéries par feuille dans le cas où la population totale est faible : 10 000 bactéries par feuille et où la lecture est faite à partir de la solution mère, mais seulement de 4 000 si la population totale atteint 10^6 germes puisque la lecture est faite sur les boîtes contenant la dilution au 1/100.

La même méthode est utilisée pour le dénombrement du nombre de *Ps. persicae* sur les fleurs; par contre il est nécessaire de peler les fruits et de broyer les épluchures dans l'eau stérile pour déterminer le nombre de bactéries par fruit.

2. RESULTATS

21. Etude des variations de *Ps. persicae* sur les feuilles

211. Le matériel végétal

Le tableau 9 (p. 43) récapitule le matériel végétal qui a servi aux prélèvements hebdomadaires durant toute la période végétative. Les feuilles qui ne présentent aucune lésion visible sont prélevées à 1,50 m du sol, dans les 4 orientations cardinales, sur 4 arbres localisés en un point précis du verger, afin qu'ils ne subissent aucun traitement bactéricide. Dans 3 des 10 vergers étudiés la maladie n'a pas été observée.

212. Présence sur les feuilles de *Ps. persicae*

Ps. persicae n'est présent que sur les feuilles provenant des 7 vergers où la maladie avait été diagnostiquée préalablement; dans les vergers sains le germe n'a jamais été détecté. Il existe donc une différence fondamentale entre la biologie de *Ps. persicae* d'une part et de *Ps. mors-prunorum* et *Ps. syringae* d'autre part, qui sont des constituants normaux de la microflore de surface des feuilles.

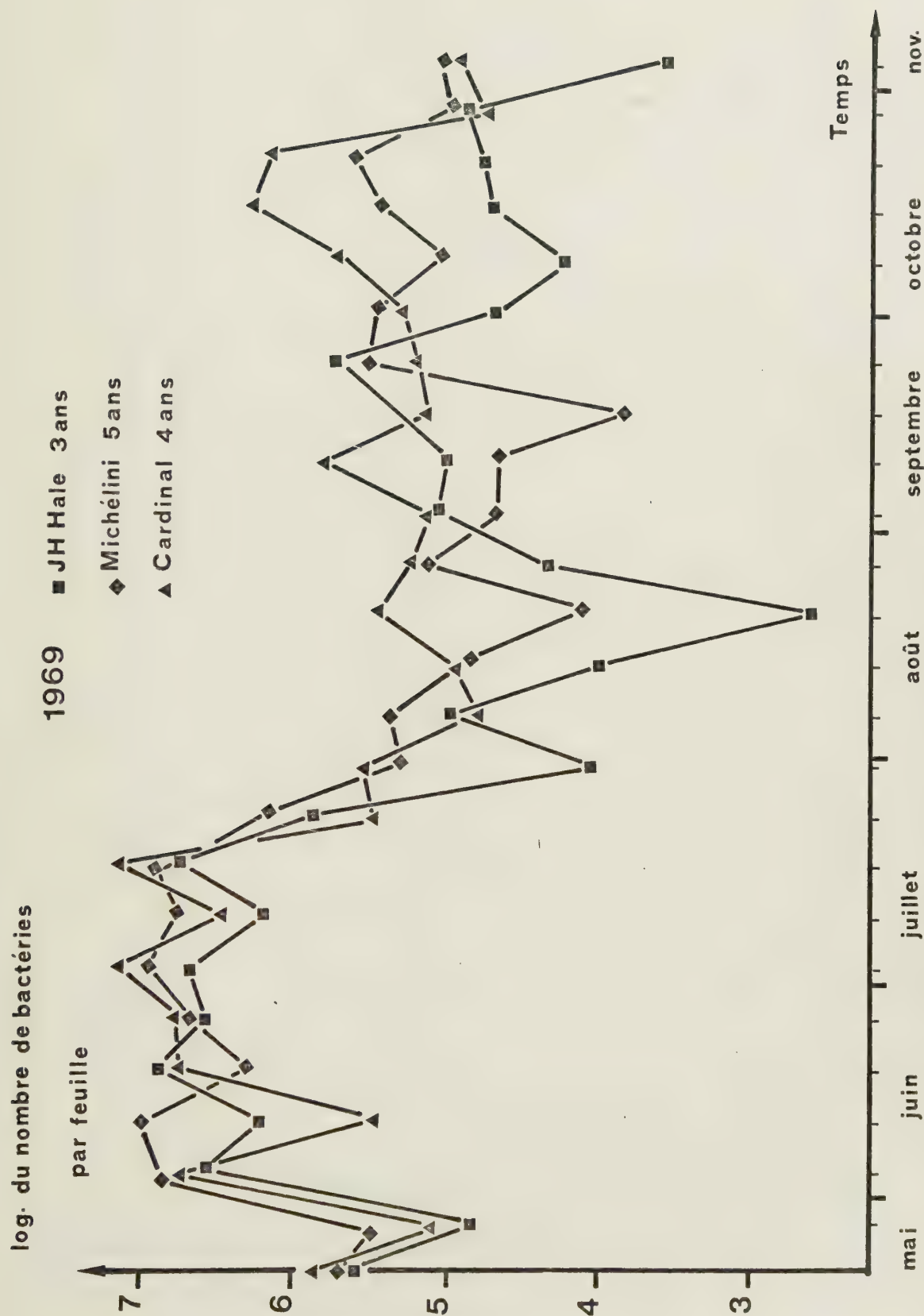


Fig. 12. VARIATIONS DU NOMBRE DE *PS. PERSICAE* PRESENTS SUR LES FEUILLES DANS TROIS VERGERS : J.H. HALE 3 ANS, MICHELINI 5 ANS ET CARDINAL 4 ANS, ANNEE 1969.

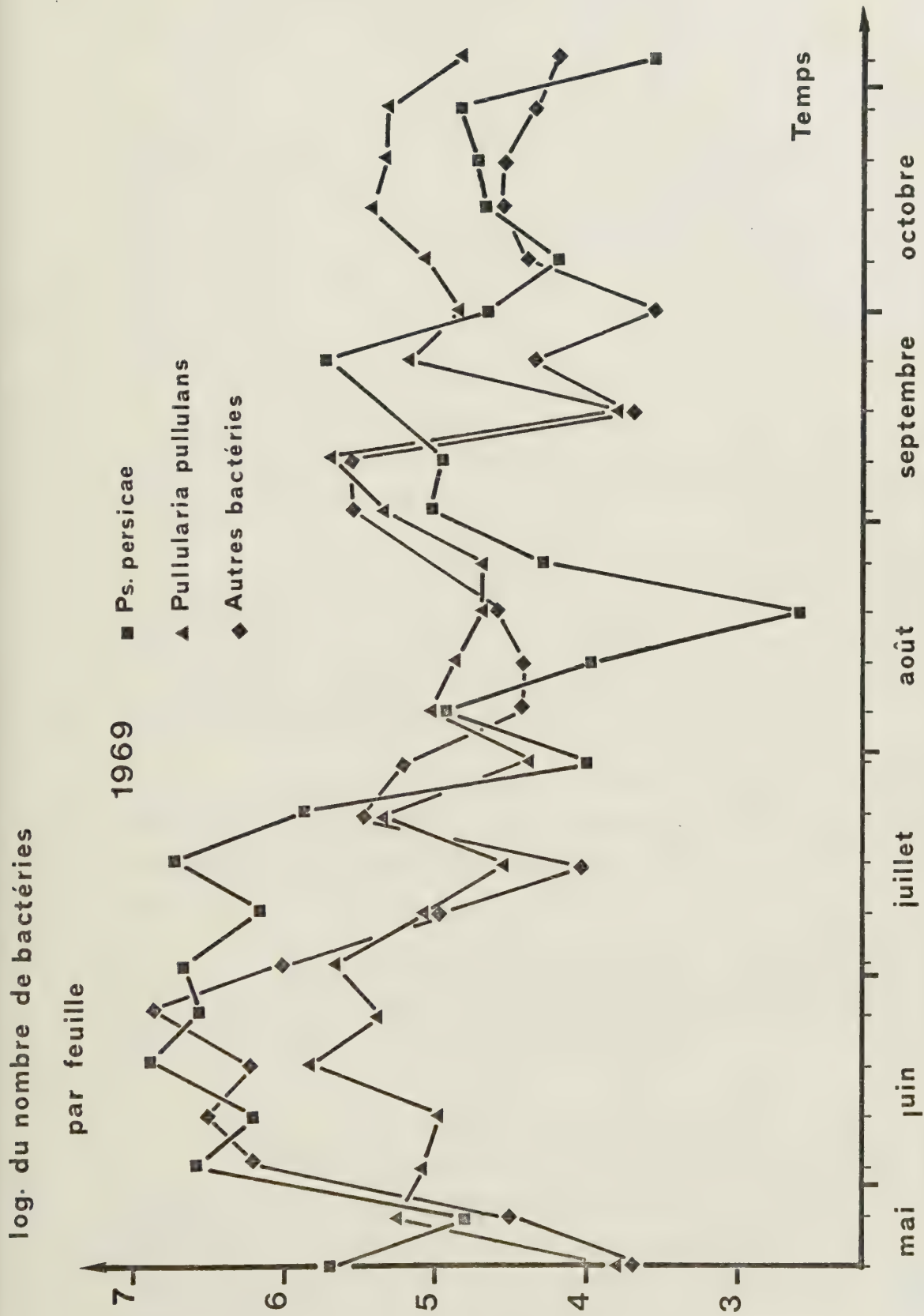


Fig. 13. VARIATIONS DU NOMBRE DE MICROORGANISMES PAR FEUILLE (*PS. PERSICAE*, *PULLULARIA PULLULANS* ET AUTRES BACTERIES) : J.H. HALE 3 ANS, ANNÉE 1969.

213. Variation des différents constituants de la microflore de surface des feuilles

2131. Année 1969 (fig. 12 et 13)

Ps. persicae est présent sur les feuilles provenant des vergers contaminés, à des taux variables au cours de la période végétative. Le nombre de bactéries par feuille, compris entre 10^5 et 10^6 lors de la première analyse, varie ensuite et atteint un niveau supérieur à 10^6 au 4 juin; du 4 juin au 23 juillet il se maintient à un niveau très élevé, compris entre 10^6 et 10^7 . Du 30 juillet au 16 septembre des variations importantes, entre 10^3 et 10^5 , sont observées, alors que, du 23 septembre au 5 novembre le niveau est compris entre 10^4 et 10^6 . De mai à juillet le nombre de bactéries par feuille est élevé et voisin pour les trois variétés; ensuite la variété Cardinal conserve une quantité de bactéries assez constante, alors que, pour les variétés J.H. Hale et Michelini des variations de plus ou moins grande amplitude sont observées.

A titre d'exemple, la fig. 13 donne pour la variété J.H. Hale les variations de *Ps. persicae*, des autres bactéries et de *Pullularia pullulans*. Les autres bactéries subissent des variations relativement comparables à *Ps. persicae*, à part un décrochement plus rapide en été. Le niveau de *Pullularia pullulans* est assez constant puisqu'il oscille entre 10^4 et 10^5 .

La population totale (*Ps. persicae* compris) des germes présents sur les feuilles ne semble pas être influencée par l'âge des arbres, elle est plus importante pour une même variété dans un verger contaminé que dans un verger sain.

Il ne semble pas non plus y avoir de relation entre le niveau des populations de *Ps. persicae* et la sensibilité variétale (Michelini est peu sensible alors que J.H. Hale est très sensible).

2132. Année 1970 (fig. 14 et 15)

La quantité de *Ps. persicae* par feuille est comprise entre 10^6 et 10^7 pour toutes variétés sauf pour Fairhaven, ensuite on assiste à une diminution progressive jusqu'au 9 juin puis à des variations plus ou moins importantes jusqu'au 14 juillet et au 28 juillet pour J.H. Hale 5 ans. Après, le nombre de bactéries est inférieur au zéro technique.

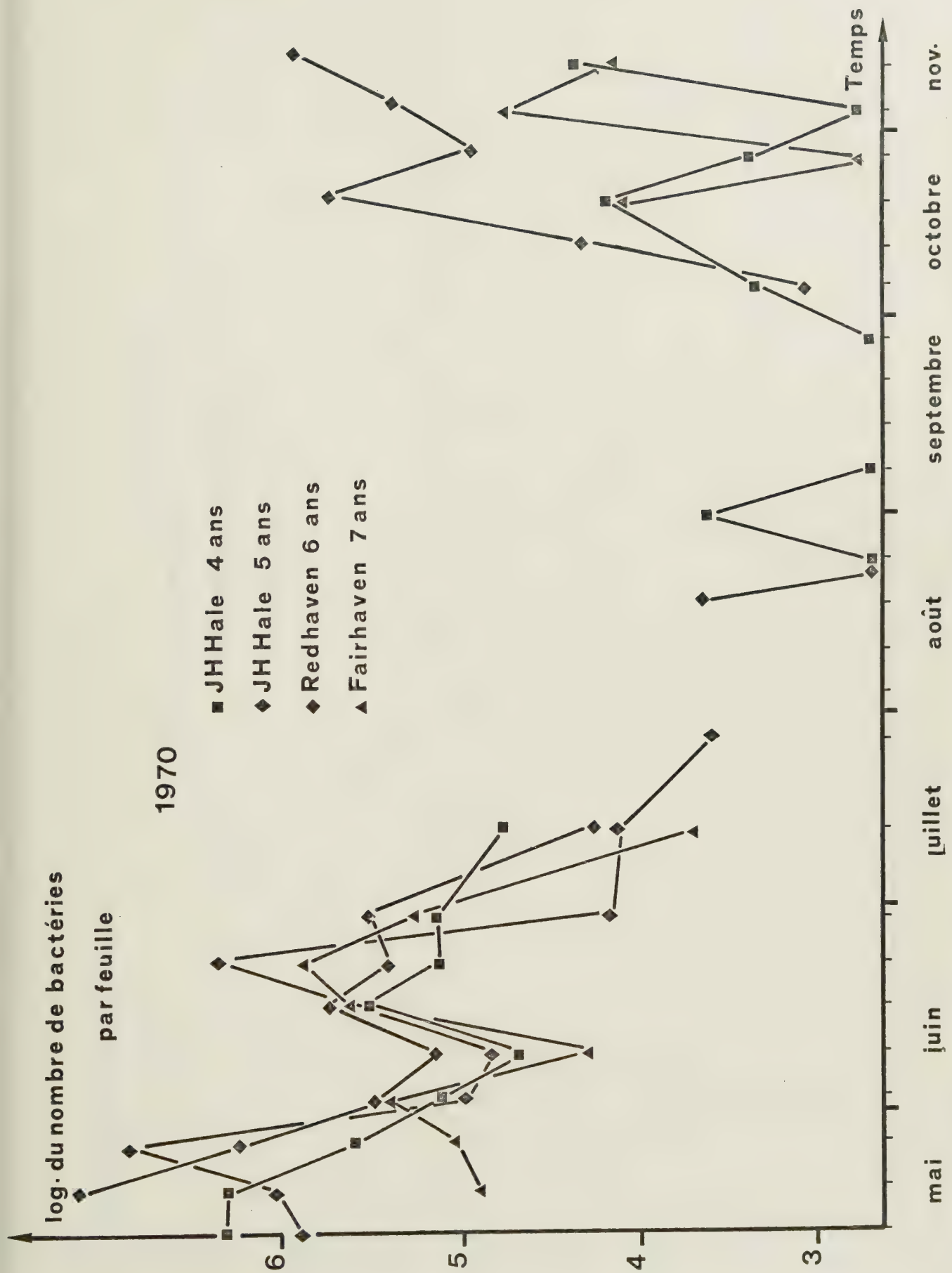


Fig. 14. VARIATIONS DU NOMBRE DE *PS. PERSICAE* PRESENTS SUR LES FEUILLES DANS 4 VERGERS : J.H. HALE 4 ANS,

J.H. HALE 5 ANS, REDHAVEN 6 ANS, FAIRHAVEN 7 ANS, ANNEE 1970.

log. du nombre bactéries

par feuille

1970 ■ *Ps. persicae*

▲ *Pullularia pullulans*

◆ autres bactéries

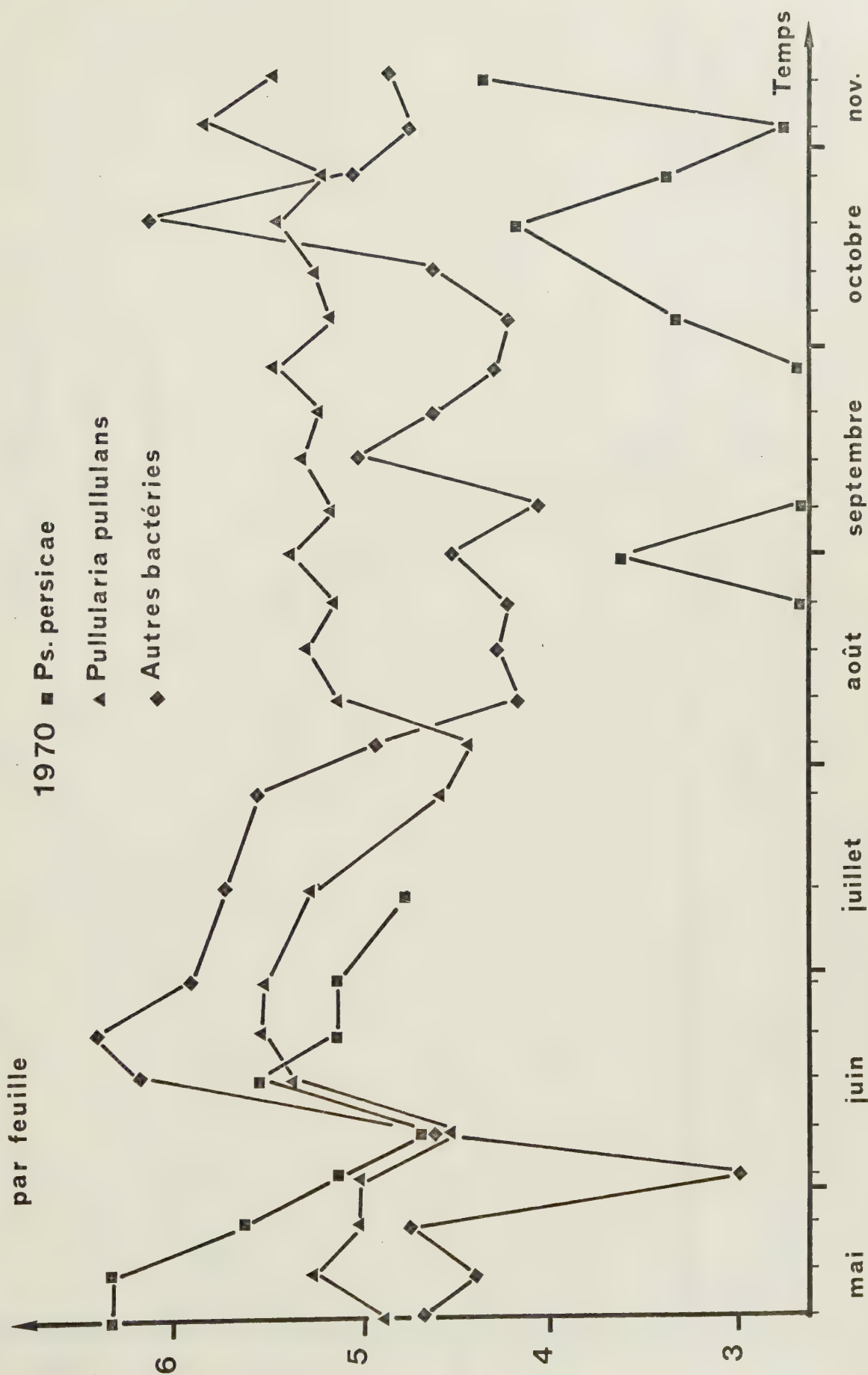


Fig. 15. VARIATIONS DU NOMBRE DE MICROORGANISMES PAR FEUILLE (*Ps. persicae*, *PULLULARIA PULLULANS* ET AUTRES BACTERIES) : J.H. HALE 4 ANS, ANNEE 1970.

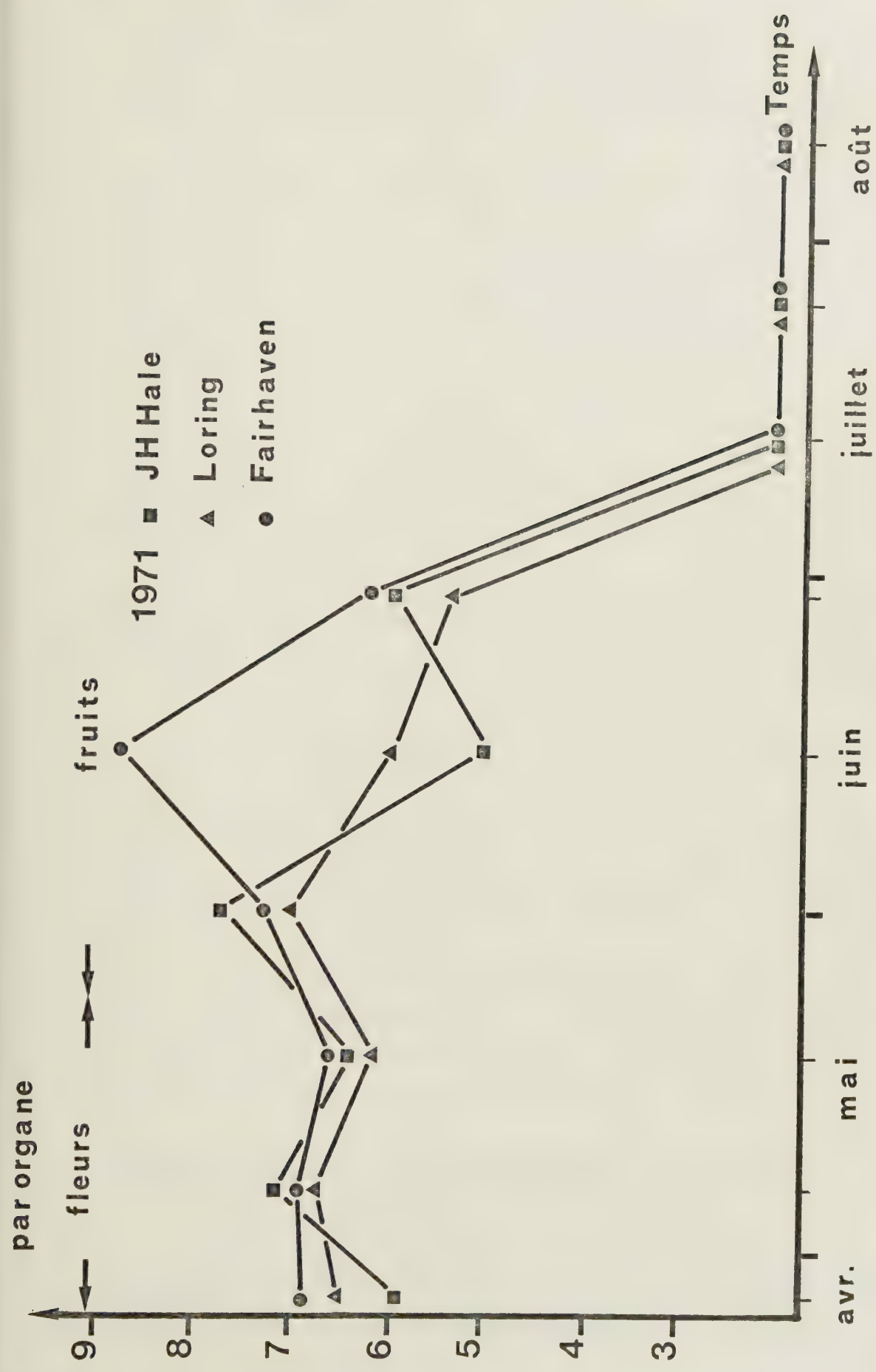


Fig. 16. VARIATIONS DU NOMBRE DE *PS. PERSICAE* PAR FLEUR ET PAR FRUIT DANS 3 VERGERS : J.H. HALE, LORING, ET FAIR HAVEN, ANNEE 1971.

L'agent pathogène n'est détecté en août que pour J.H. Hale 4 ans et Redhaven 6 ans (fig. 14); la bactérie réapparaît fin septembre sur J.H. Hale 4 ans et début octobre sur Redhaven 6 ans et Fairhaven 6 ans. *Ps. persicae* disparaît définitivement le 28 juillet chez J.H. Hale 5 ans.

En 1970, les courbes d'évolution de *Ps. persicae* sur les feuilles, sont différentes de celles observées en 1969 : le nombre de bactéries par feuille, aussi élevé en mai, diminue progressivement au printemps et tombe au dessous du zéro technique en juillet et pendant l'été; de plus des variations de grande amplitude sont observées. On peut, en partie, attribuer ces différences aux conditions climatiques car l'été 1970 a été très sec et chaud.

Les autres bactéries (fig. 15), tout en subissant des variations de grande amplitude, se trouvent presque toujours, sauf en mai et début juin, à un niveau supérieur à celui de *Ps. persicae*. L'importance relative des types chromogènes en été est une modification qualitative caractéristique.

Pullularia pullulans reste à un niveau assez constant, voisin de 10^5 germes par feuille, et suit une évolution assez comparable selon les variétés; il est cependant difficile d'établir des tendances d'évolution suivant les saisons.

22. Variations de *Ps. persicae* sur la surface des fleurs et des fruits

Les fleurs et les fruits sont également pollués par *Ps. persicae*. La fig. 16 donne, pour 3 variétés, l'évolution du nombre de bactéries par fleur, puis par fruit; le niveau de pollution varie de 10^5 à 10^8 jusqu'au 28 juin, et tombe au dessous du zéro technique pour toutes les variétés au 15 juillet.

Le niveau de pollution des fruits mûrs est sinon nul du moins très faible. Sur le plan épidémiologique, la présence de la bactérie sur les fleurs est importante car les insectes butineurs peuvent transporter la bactérie d'une fleur à l'autre et d'un arbre à l'autre etc...

3. INVENTAIRE SOMMAIRE DES GERMES PRESENTS SUR LA FEUILLE

31. Les *Pseudomonas*

160 isolats de *Pseudomonas* ont été prélevés en 1969, soit pour confirmation d'identité (*Ps. persicae*) soit pour caractérisation précise sur la base des critères biochimiques mentionnés précédemment.

	Nombre d'isolats	King B	Levane	Oxydase	Pectine (dépolymérase)	Arginine dihydrolase	2 céto-glucuronate	Nitrate réductase	Saccharose	Hydrolyse de l'aesculine	Gélatinase	Tyrosine
<i>Ps. mors-prunorum</i> f. <i>sp. persicae</i>	40 56	1 1	++	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1	++	1 1	1 1	1 1
<i>Ps. syringae</i>	2	+	+	1	1	1	1	1	+	+	+	-
<i>do</i>	12	+	+	1	1	1	1	1	+	+	+	v
<i>do</i>	1	+	+	1	1	1	1	1	+	+	+	-
<i>do</i>	1	+	+	1	1	1	1	1	+	+	+	v
<i>do</i>	19	+	+	1	1	1	1	1	+	+	+	+
<i>do</i>	1	+	+	1	1	1	1	1	+	+	+	v
<i>Ps. viridiflava</i>	4	+	+	1	+	+	1	1	+	+	+	+
<i>Ps. fluorescens</i>	3	+	+	1	1	+	1	1	+	+	+	+
Autres <i>Pseudomonas</i>	1	+	+	1	1	+	1	1	+	+	+	+
Autres <i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	+	+	1	1	+	1	1	+	+	+	+

+ réaction positive; - réaction négative; + v, - v réaction positive ou négative avec production d'un pigment vert.

* D'après GARDAN L., PRUNIER J.P., LUISETTI J., 1972, Ann. Phytopathol., 4 (3) p. 234.

TABEAU 10. PRINCIPAUX CARACTERES DES *PSEUDOMONAS* FLUORESCENTS ISOLEES DE LA FLORE EPIPHYTE DU PECHER

En plus de *Ps. persicae*, des *Pseudomonas* fluorescents sont présents sur la surface des feuilles de Pêcher : *Ps. syringae*, *Ps. viridiflava*, *Ps. fluorescens* et d'autres *Pseudomonas* inclassables : tableau 10.

Dans tous les cas nous avons pu confirmer l'identité de *Ps. persicae* à l'aide des caractères biochimiques; 56 isolats sur 96 possèdent une tyrosinase. L'utilisation des phages a permis de définir six lysotypes dont un dominant. Les bactéries présentes sur la surface des feuilles sont virulentes, car inoculées aux rameaux mixtes en octobre, elles provoquent les lésions typiques.

Différents biotypes de *Ps. syringae* sont différenciés sur la base de l'hydrolyse de l'aesculine et de la présence d'une gélatinase et d'une tyrosinase. De très nombreux lysotypes ont été déterminés; la variabilité de *Ps. syringae* est ainsi confirmée. Trois isolats ont un lysotype identique à celui de *Ps. syringae*; les phages ne peuvent donc pas être utilisés seuls pour la détermination de l'agent pathogène.

Ps. viridiflava n'est rencontré qu'occasionnellement sur les feuilles de Pêcher; il en est de même de *Ps. fluorescens* qui est surtout présent sur les végétaux près du sol ou dans le sol lui-même.

32. Les autres groupes de bactéries

Les critères classiques d'identification utilisés en phytobactériologie (Gram, mobilité et position des flagelles, type respiratoire, voie de métabolisme du glucose, présence de nitrate réductase, etc...) ont permis de classer 394 isolats prélevés en 1970 (LUISETTI, GARDAN, PRUNIER, à paraître) :

Gram positif : 58

- . 9 Cocci
- . 39 *Bacillus* (principalement) et coryneformes
- . 10 Levures

Gram négatif : 336

- . 191 Entérobactéries
- . 89 *Pseudomonas* fluorescents
- . 56 appartenant à divers genres :
 - 11 *Achromobacter*
 - 5 *Acinetobacter*
 - 3 *Aeromonas*
 - 5 *Flavobacterium*
 - 32 *Pseudomonas* non fluorescents.

Les entérobactéries sont largement représentées puisqu'elles constituent environ 50 % des isolats étudiés. D'après les caractères donnés par LE MINOR (1972), nous avons déterminé les espèces suivantes :

<u>NOM</u>	<u>NOMBRE DE SOUCHES*</u>
<i>Escherichia coli</i>	4
<i>Proteus morganii</i>	1
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Kl. pneumoniae var. oxytoca</i>	1
<i>Kl. ozenae</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	9
<i>Ent. liquefaciens</i>	8
<i>Ent. hafniae</i>	3
<i>Enterobacter agglomerans</i>	
= <i>Erwinia herbicola</i>	
. pigmenté en jaune	32
. non pigmenté	94

* 36 isolats sur les 191 sont morts en cours de conservation.

Les entérobactéries médicales sont bien évidemment des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux mais certaines d'entre elles sont aussi très répandues dans la nature, dans le sol, les eaux et l'air; il n'est pas trop surprenant d'en rencontrer certaines occasionnellement sur les végétaux (TYSSET, BRISOU, DURAND, 1971). Par contre, *Erwinia herbicola* qu'il s'agisse d'espèces pigmentées ou non, est un hôte normal des végétaux soit en surface des organes soit comme contaminant secondaire des lésions provoquées par des bactéries phytopathogènes; cette espèce très étudiée en ce moment, n'est pas homogène et de nombreux biogroupes ont été décrits.

Les bactéries à Gram négatif, aérobies strictes, utilisant le glucose par voie oxydative ou non peuvent être identifiées d'après la clef suivante :

1. Pigment diffusible fluorescent

flagelles polaires, cytochrome c oxydase
positive ou négative, résistant à la

pénicilline : *Pseudomonas*

2. Pigment non diffusible

21. flagelles péritriches, cytochrome c
oxydase positive ou négative, sensi-

ble à la pénicilline : *Flavobacterium*



Planche 3 : MISE EN EVIDENCE DU POUVOIR ANTAGONISTE DE BACTERIES
 ISOLEES DE LA SURFACE DES FEUILLES DE PECHER.

- Photographie n°8 : Trois souches sont antagonistes de *Ps. persicae* : B37R (*E. herbicola*), B 95R1 (*Acinetobacter* sp.), F45R1 (*Bacillus* sp.). La souche A 634aR2 (*E. herbicola*) n'est pas antagoniste.
- Photographie n°9 : Les souches D269bR1 (*Pseudomonas fluorescent*), B266R (*Acinetobacter* sp.) sont fortement antagonistes de *Ps. persicae*, alors que 2 isolats de C 177 (*Pseudomonas fluorescent*) sont faiblement antagonistes.

22. Flagelles polaires, cytochrome c
oxydase positive ou négative, résistant
à la Pénicilline : *Pseudomonas*,
Xanthomonas
23. pas de flagelles : *Empedobacter*,
Cytophaga
3. Pas de pigment
31. flagelles péritriches, cytochrome c oxy-
dase positive ou négative, sensible à
la pénicilline : *Achromobacter*
32. pas de flagelles
321. Cytochrome c oxydase négative,
résistant à la Pénicilline : *Acinetobacter*
322. Cytochrome c oxydase positive,
sensible à la Pénicilline : *Moraxella*

L'identification de ces groupes de germes pose de gros problèmes et la clé d'orientation que nous proposons ici est pratique à utiliser.

33. Présence de bactéries antagonistes de *Ps. persicae*

331. Appréciation du pouvoir antagoniste

19 ml de milieu LPGa sont coulés dans chaque boîte de Pétri de 10 cm de diamètre; après solidification du milieu les boîtes sont séchées ouvertes, pendant 45 mn, dans une étuve à 37°C. La surface de la gélose estensemencée avec une culture en phase exponentielle de *Ps. persicae* de concentration suffisante pour obtenir une culture juste confluyente de colonies; après séchage pendant une heure, une goutte de culture concentrée de la souche dont le pouvoir antagoniste est à mettre en évidence, est déposée sur la gélose. 4 souches sont testées dans chaque boîte et le diamètre d'inhibition est mesuré après 1, 2 et 4 jours d'incubation (photo n°8 et 9; planche 3).

332. Résultats

Sur les 394 isolats testés suivant cette méthode, 23 souches donnent une zone d'inhibition de 1 à 26 mm de diamètre, sans repousses de mutants résistants (Photo n°8 et 9). Les souches se répartissent de la façon suivante :

1 *Cocci* Gram positif, 1 *Bacillus*, 2 *Pseudomonas* fluorescents, 5 *Acinetobacter*, 1 *Flavobacterium* sp., 2 *E. coli*, 1 *Ent. liquefaciens*, 2 *Ent. hafniae*, 1 *Ent. cloaca*, 7 *Erwinia herbicola*; 13 souches antagonistes sur 23 appartiennent au groupe des entérobactéries.

4. CONCLUSIONS

41. Présence de *Ps. persicae* sur la surface des feuilles de Pêcher

La méthode que nous avons utilisée a permis d'établir que *Ps. persicae* est présent sur la surface des feuilles de Pêcher, dans les vergers où la maladie est déjà présente; en France cette bactérie n'est donc pas épiphyllé sur tous les Pêchers comme *Ps. mors-prunorum* sur Cerisier (CROSSE, 1963) et *Ps. syringae* sur Poirier (LUISETTI, PAULIN, 1972). Ce fait renforce l'hypothèse de l'apparition de la maladie en un point donné de l'Ardèche et de son extension progressive à partir du ou des foyers primitifs.

Les variations saisonnières se trouvent confirmées la deuxième année de l'étude : le nombre de bactéries par feuille apparaît élevé au printemps (10^5 à 10^7), plus faible voire au dessous du zéro technique en été et moyen à l'automne (10^4 à 10^5) au moment de la chute des feuilles. Au printemps le nombre de *Ps. persicae* par bourgeon et jeune feuille est important (10^6 à 10^7); ces bactéries proviennent des lésions de rameaux où la multiplication des bactéries est intense jusqu'au débourrement. Cet inoculum peut être considéré comme responsable des lésions sur feuille et des nécroses sur fruit au printemps et en été. En Ardèche la chute des feuilles s'étale d'octobre jusqu'à début novembre, à cette période la quantité de *Ps. persicae* par feuille varie de 10^3 à 10^6 . Par ailleurs nous avons montré que les bactéries peuvent pénétrer dans la plante par l'intermédiaire des cicatrices foliaires récentes et que les tissus du Pêcher étaient sensibles à la bactérie pendant toute la période de la chute des feuilles (avec un maximum à 65 % de la chute des feuilles). On peut donc admettre que les bactéries présentes sur la surface des feuilles sont la principale source d'inoculum pour la contamination des plaies pétiolaires. Pendant toute la période végétative ou seuls les feuilles et les fruits permettent la multiplication des bactéries dans les tissus, *Ps. persicae* se maintient sur la feuille jusqu'à l'automne, époque où il peut pénétrer dans les tissus par l'intermédiaire des plaies laissées par la chute de la feuille.

42. La vie épiphyllé des bactéries phytopathogènes

La vie épiphyte de plusieurs bactéries phytopathogènes des arbres fruitiers est maintenant bien connue. En Angleterre CROSSE (1963) sur Cerisier dénombre 10^4 à 10^6 cellules de *Ps. mors-prunorum* par feuille en automne. Aux Etats Unis, ENGLISH et DAVIS (1960) signalent la présence de *Ps. syringae* sur les feuilles et les fruits de Pêcher, à des niveaux élevés au printemps et moyens en automne. En France sur le Poirier, LUISETTI et PAULIN (1972) trouvent des populations importantes de *Ps. syringae* sur les fleurs et les feuilles au printemps (10^6 à 10^7 cellules par organe) et plus faibles en été (10^2 à 10^3 germes par feuille). PANAGOPOULOS (1966) aboutit à des constatations voisines sur Citronnier et Oranger en Grèce où il dénombre 10^3 à 10^5 cellules de *Ps. syringae* par cm² de

feuille en hiver et au printemps. Plus récemment la phase épiphyllle de plusieurs bactéries vient d'être démontrée : *Ps. savastanoi* sur Olivier (ERCOLANI, 1975), *Erwinia amylovora* (MILLER, SCHROTH, 1972), *Xanthomonas pruni* (DHANVANTARI, 1973) et *Xanthomonas juglandis* (GARDAN, LUISETTI, PRUNIER, 1973).

Il semble que quelques *Pseudomonas* comme *Ps. mors-prunorum*, *Ps. syringae*, *Ps. persicae* et peut-être quelques *Xanthomonas* comme *X. juglandis* aient l'aptitude à vivre et à survivre sur la surface de la feuille puisque des quantités importantes de bactéries sont présentes sur le feuillage en l'absence de sources d'inoculum comme des lésions évolutives sur rameaux, feuilles et fruits. Ces germes sont particulièrement adaptés à la vie épiphyllle ce qui leur permet de survivre jusqu'à l'automne au moment où la bactérie va pouvoir atteindre les tissus sensibles. Pour d'autres germes comme *Erwinia amylovora* il n'existe sans doute pas de véritable vie épiphyte.

43. La méthode de détection

Au bout de 4 heures d'agitation CROSSE (1959) estime qu'il ne dénombre que 80 à 90 % du nombre de *Ps. mors-prunorum* présents sur la feuille de Cerisier; en effet le reste des germes est récupéré en renouvelant le liquide de lavage à chaque comptage à partir de 4 heures. Malgré cette imprécision nous pensons que la méthode utilisée permet d'avoir une bonne idée du nombre de bactéries présentes sur les feuilles, à un moment donné et de suivre leur évolution dans le temps.

Cette méthode ne permet ni d'apprécier la proportion relative du nombre de bactéries présentes à la surface inférieure et supérieure de la feuille ni de localiser la répartition des bactéries sur le limbe. FREIGOUN (1975) a montré que *Ps. mors-prunorum* était principalement localisé sur la surface inférieure des feuilles de Cerisier et le long des poils. La méthode des empreintes sur collodion et marquage des bactéries par immunofluorescence pourrait permettre de localiser les bactéries sur la surface du limbe de la feuille (COLENO, 1975).

44. Les facteurs conditionnant la vie épiphyte des bactéries

MANGENOT (1966) récapitule les caractéristiques physiques (pH, intensité lumineuse, température, humidité) et chimiques de la phyllosphère susceptibles d'avoir une influence sur les populations bactériennes parasites et saprophytes. L'étude de l'influence de ces facteurs pris isolément ou en combinaison sur la composition quantitative et à fortiori la composition qualitative pose de très nombreux problèmes et au cours des deux derniers congrès traitant d'écologie microbienne de la surface des feuilles : Newcastle en 1970 et Wye en 1975, très peu de communications traitent de ce sujet.

45. La composition de la microflore bactérienne épiphyll

Il semble que les bactéries et levures sont de beaucoup les plus importantes en nombre sur la surface de la feuille si l'on met de côté le champignon *Pullularia pullulans* qui est rencontré sur beaucoup de plantes.

Quelques études mentionnent un inventaire partiel ou total des bactéries présentes sur les feuilles des plantes pérennes : *Citrus* et Cacaoyer (RUINEN, 1961), Hêtre (JENSEN, 1971), Poirier (LUISETTI et PAULIN, 1972), Oranger et Citronnier (PANAGOPOULOS, PSALLIDAS, 1973), Poirier, Pommier, Aubépine (BILLING, HUTSON, 1975), Poirier, Pommier, Aubépine (PAULIN, SAMSON, 1975), Peuplier (RIDE, RIDE S., 1975) et Olivier (ERCOLANI, 1975).

Sur feuille de *Citrus* sous climat tropical, RUINEN (1961) met en évidence les genres bactériens suivants : *Clostridium*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Aerobacter* et *Spirillum*. Sur le Hêtre JENSEN (1971) identifie des *Pseudomonas* fluorescents ou non, les genres *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces* et quelques bactéries sporulées. Au niveau des feuilles des arbres fruitiers mis à part les bactéries pathogènes les germes les plus fréquents sont les *Pseudomonas* fluorescents (*Ps. syringae*, *Ps. viridiflava*, *Ps. fluorescens* et des *Pseudomonas* inclassables pectinolytiques), les *Pseudomonas* non fluorescents dont certains pigmentés en jaune, les Entérobactéries comme *Escherichia coli*, *Klebsiella* (*Kl. pneumoniae*, *Kl. oxytoca*, *Kl. ozenae*), *Proteus morganii*, *Providencia alcalifaciens*, *Enterobacter* (*Ent. hafniae*, *Ent. cloacae*, *Ent. liquefaciens*) et *Erwinia herbicola* pigmenté en jaune ou non, *Serratia marcescens*; d'autres genres bactériens ont été également cités : *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus*.

Dans la microflore épiphyll^{les} bactéries Gram négatif sont largement dominantes alors que les bactéries Gram positif comme les *Bacillus*, les *Lactobacillus*, les *Cocci*, les corynéformes et les Actinomycètes n'y sont rencontrés qu'occasionnellement. Il est possible que les techniques utilisées (milieux de culture, température d'incubation) ne permettent pas de déceler certains germes exigeants comme les *Lactobacillus*. De plus, étant donné le niveau des populations bactériennes de l'ordre de 10^6 bactéries et plus par feuille, il est possible que certains germes présents en petit nombre, ne soient pas mis en évidence.

46. Interactions bactériennes au niveau de la feuille

Etant donné la complexité des populations microbiennes de la surface de la feuille, il est probable que des phénomènes d'antagonismes régissent en partie les équilibres au sein de ces populations. BILLING et HUTSON (1975) ont

montré que des souches d'*Erwinia herbicola* étaient antagonistes in vitro d'*Erwinia amylovora*. PAULIN et SAMSON (1975) trouvent que 40 % des germes de la microflore de surface du Poirier, du Pommier et de l'Aubépine sont antagonistes in vitro d'*Erwinia amylovora*; la majorité de ces antagonistes appartiennent à la famille des *Pseudomonadacées*. GARDAN, PRUNIER, LUISETTI (1975) recensent sur feuille de Pêcher entre 5 à 10 % de bactéries antagonistes de *Ps. persicae* dont une majorité d'Entérobactéries. Ces souches pourront peut-être servir à mettre au point des méthodes de lutte biologique.

CHAPITRE III

LA LUTTE CONTRE *PSEUDOMONAS PERSICAE*

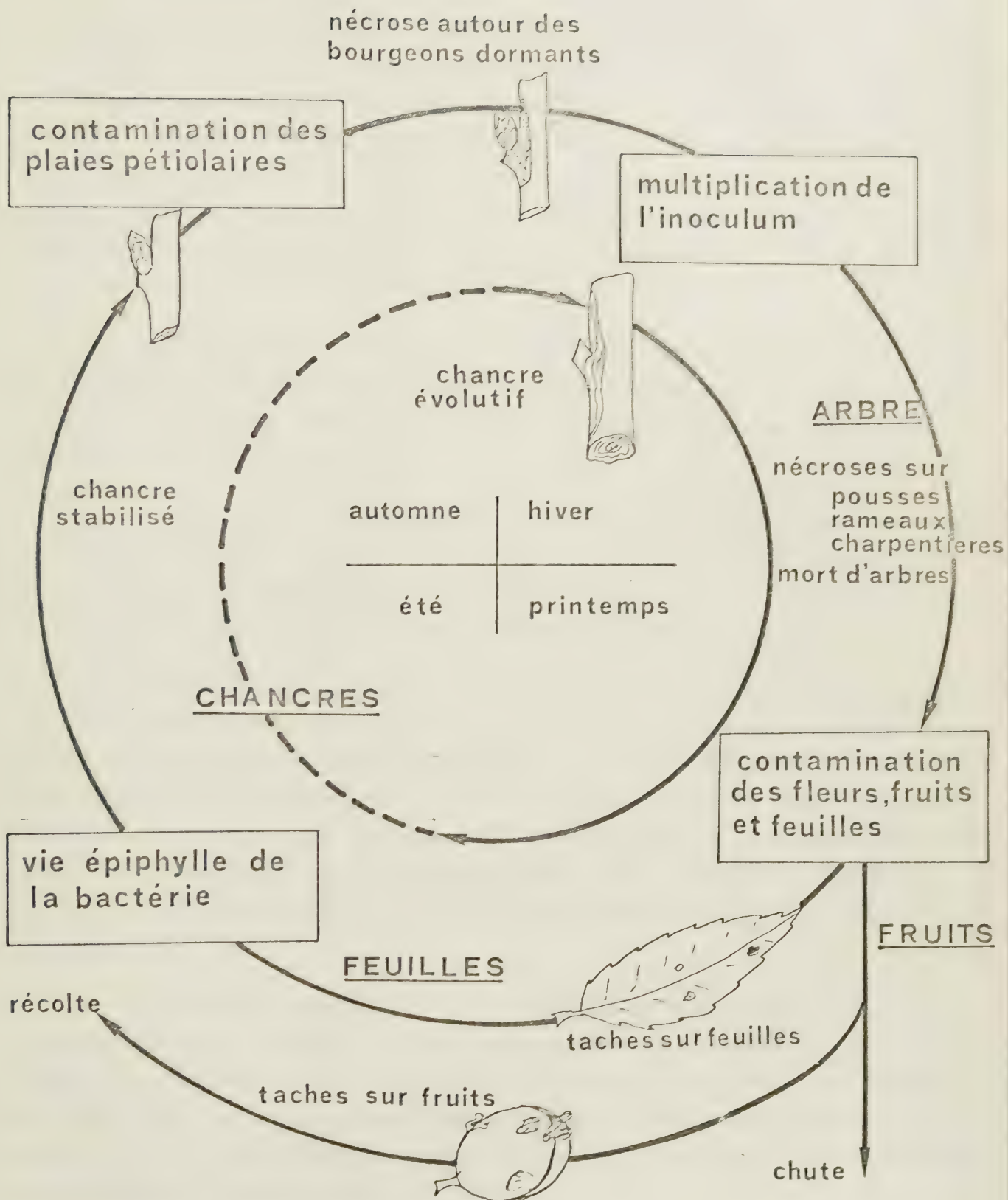


Fig. 17. CYCLE BIOLOGIQUE DE *PS. PERSICAE*.

1. LE CYCLE BIOLOGIQUE DE *PSEUDOMONAS PERSICAE*

Une bonne connaissance de la biologie des bactéries phytopathogènes est indispensable pour orienter et étudier les différents moyens de lutte contre ces germes. Dans l'étude de cette nouvelle maladie (le dépérissement bactérien du Pêcher), nous avons dans un premier temps isolé et caractérisé la bactérie et reproduit intégralement les symptômes naturels par l'inoculation du germe obtenu en culture pure; dans un deuxième temps nous avons étudié les particularités du cycle biologique de cette bactérie : sensibilité des tissus, voies de pénétration, présence épiphyllé. Les principales phases du cycle biologique de *Ps. persicae* sont maintenant bien établies (fig. 17).

La pénétration de la bactérie dans les tissus peut se faire au travers des plaies artificielles : plaies de taille et tout autre plaie, et des ouvertures naturelles : plaies pétiolaires, lenticelles pour les rameaux et stomates pour les feuilles.

La durée de réceptivité des plaies pétiolaires est courte, de l'ordre de 0 à 24 heures. La sensibilité des rameaux de Pêcher s'étale d'octobre à février, elle est maximale à 60 % de la chute des feuilles. 50 bactéries mises au contact avec les tissus suffisent à déclancher le processus infectieux.

A l'automne, le nombre de bactéries par feuille est de l'ordre de 10^5 ; ces bactéries virulentes en suspension dans l'eau de pluie ou de rosée sont mises en contact avec les plaies pétiolaires et peuvent pénétrer par cette voie, dans les tissus des rameaux. Après un temps d'incubation de 2 à 3 mois pendant lequel les bactéries se multiplient, les premiers symptômes visibles apparaissent localisés autour des bourgeons dormants. Pendant tout l'hiver, les bactéries vivent dans les tissus de l'arbre qu'elles altèrent; les parties lésées de l'arbre meurent.

L'inoculum produit en hiver, contamine les organes néoformés au printemps (fleurs, feuilles, fruits, rameaux herbacés). La bactérie peut se multiplier dans les tissus des feuilles et les fruits où l'on observe des symptômes évolutifs. Dans les chancres et nécroses sur rameaux les bactéries meurent rapidement à partir du débourrement. Pendant toute la période végétative, *Ps. persicae* se maintient sur les feuilles.

Cette alternance de phase interne dans les tissus et de phase externe sur les feuilles, constitue une remarquable adaptation parasitaire de ce germe. Pour *Ps. syringae* agent du dessèchement bactérien des pousses du Poirier, la survie du germe pendant l'hiver est aléatoire puisque cette bactérie se conserve sur la surface des rameaux ou au niveau des bourgeons.

La connaissance des phases importantes du cycle de *Ps. persicae*, permet de mieux comprendre le développement du dépérissement bactérien du Pêcher et de définir les différents moyens de lutte. Cependant certains points de ce cycle restent à élucider :

- . quel est le rôle des plaies de taille comme voie d'entrée de la bactérie dans les tissus ? Il est sans doute peu important, puisqu'en Ardèche, la taille se pratique courant février, début mars, époque où les tissus sont peu sensibles. On observe cependant des chancres centrés autour de plaie de taille, qui peuvent peut-être assurer la conservation de l'inoculum d'une année à l'autre.

- . le sol permet-il la conservation de la bactérie et pendant combien de temps ? La plupart des bactéries phytopathogènes adaptées au système aérien des plantes se conserveraient peu de temps dans le sol; il est cependant difficile d'être affirmatif sur ce sujet car la détection des *Pseudomonas* phytopathogènes est difficile dans le sol. La maladie est apparue très rapidement dans des plantations de jeunes Pêchers faites dans des parcelles où les arbres âgés malades avaient auparavant été arrachés et détruits.

- . quel est le rôle des feuilles dans le transport de l'inoculum ? La bactérie se conserve sur les feuilles détachées de l'arbre à l'automne tant que leur pigmentation reste verte; les feuilles emportées par le vent peuvent peut-être permettre le transport de ce germe à plus ou moins longue distance.

2. LES DIFFERENTS MOYENS DE LUTTE

Une méthode de lutte efficace contre une maladie a pour but de rompre le cycle biologique de l'agent pathogène, en éliminant les sources et la multiplication de l'inoculum.

21. Les mesures prophylactiques

L'application des mesures prophylactiques, souvent mal comprises et négligées par les arboriculteurs permet de lutter efficacement contre un parasite. Après l'enquête épidémiologique de 1969, nous étions en mesure de préconiser les mesures suivantes dans le but de limiter l'extension de la maladie :

. Hors de la zone atteinte :

- destruction de tous les foyers limitrophes par l'arrachage et le brûlage des arbres.
- réglementation de la production de jeunes plants sains par l'élimination des quelques pépinières situées à l'intérieur de la zone contaminée et le prélèvement de greffons sur des arbres sains.

. Dans la zone contaminée :

- arrachage et brûlage des arbres malades.
- désinfection fréquente des outils utilisés au cours de la taille.
- traitement pendant la chute des feuilles par les produits cupriques classiques.

22. La lutte biologique

La lutte biologique contre les insectes est maintenant effective, notamment contre certaines larves de lépidoptères, à l'aide du cristal parasporal de nature protéique produit par *Bacillus thuringiensis*.

L'écologie microbienne de la surface de la feuille est très complexe puisque sur cet organe cohabitent champignons, levures et bactéries. Parmi les bactéries commensales, certaines ont un pouvoir antagoniste très important in vitro. Il faut maintenant vérifier le pouvoir antagoniste de ces bactéries sur les feuilles.

A l'aide de bactériophages virulents, il est possible de lutter contre les maladies bactériennes des plantes (CIVEROLO, 1972). Il serait peut-être possible de diminuer les populations de *Ps. persicae* présentes sur les feuilles à l'aide de bactériophages virulents; il faut d'abord étudier la survie de bactériophages sur la feuille, puis l'effet de la pulvérisation de bactériophages virulents sur des populations de *Ps. persicae* présentes sur les feuilles.

23. La lutte chimique.

La lutte chimique a été orientée en fonction du cycle biologique de la bactérie. Comme il est très difficile d'agir sur l'agent pathogène installé dans les tissus, nous avons choisi de l'atteindre au cours de sa phase externe épiphyllé par des agents antibactériens. La diminution importante du nombre de bactéries présentes sur les feuilles à l'automne, devrait réduire la contamination des plaies pétiolaires et ainsi agir sur le développement ultérieur de la maladie. L'application d'antibiotiques au printemps sur les feuilles, les fleurs et les

fruits pour prévenir les attaques de la bactérie sur ces organes n'a pas été envisagée; en effet nous ne connaissons pas la durée de rémanence des antibiotiques sur les fruits ni leurs effets secondaires sur les bactéries phytocommensales.

3. MISE AU POINT DE LA LUTTE CHIMIQUE

En dehors des classiques produits cupriques, la gamme des produits antibactériens disponibles sur le marché français et international est restreinte. Ceci est peut-être dû à l'importance économique relativement faible que les maladies bactériennes avaient ^{pendant} ces dernières décades.

Afin de mettre au point une lutte chimique efficace nous avons d'abord étudié *in vitro* l'activité des produits antibactériens courants contre *Ps. persicae* et vérifié *in vivo* l'efficacité des produits les plus intéressants.

31. Concentration minima inhibitrice (C.M.I.) des produits antibactériens contre *Ps. persicae*

311. Méthode de détermination de la C.M.I.

Il existe plusieurs méthodes permettant d'apprécier l'activité des produits antibactériens. Aux méthodes de la dilution en milieu liquide, et de la diffusion en gélose (antibiogramme) moins précises et moins adaptées, nous avons préféré la méthode de dilution en gélose (CHABBERT, 1972). La technique est la suivante :

- . le milieu : 19 ml de milieu gélosé sont répartis dans chaque flacon de 30 ml de capacité. Avant l'emploi, faire fondre la gélose et la maintenir dans une étuve à l'état liquide à 48-50°C.

- . Dilutions de l'antibiotique : à partir d'une solution mère 20 fois plus concentrée que la concentration maximale désirée on procède à des dilutions de demi en demi pour obtenir par exemple des concentrations finales dans le milieu allant de 0,25 µg/ml à 1024 µg/ml.

- . Préparation des boîtes : ajouter 1 ml des différentes solutions d'antibiotiques à chaque flacon de 19 ml de milieu en commençant par les concentrations les plus faibles, mélanger en retournant le flacon plusieurs fois et couler en boîte de Pétri.

- . Inoculum : les bactéries sont déposées sur la surface de la gélose à l'aide du répliqueur de STEERS. Il s'agit d'un bloc portant des tiges pleines de 3 mm de diamètre à section droite; ces tiges plongent d'abord dans des godets contenant les dilutions convenables de chaque souche bactérienne. L'ensemencement se fait sous forme d'un disque de 7 mm de diamètre contenant de 10^3 à 10^4 bactéries; 26 souches peuvent être ensemencées sur la même boîte.

Substances		Bronopol	Rifampy- cine SV	Oxychlo- rure de Cu	Ampicil- line	Oxytétra- cycline	Kanamycine	Sulfate de colimycine (U.I.)	Pyolu- téorine
Souches	Nombre								
<i>Ps. syringae</i>	8	31,2	62,5 (5)	1 000 (1) 500 (1) 250 (6)	62,5 (3) 31,2 (5)	2 (1) 1 (7)	1	1 024 (7) 512 (1)	512 (2) 1 024 (2) 2 048 (2) 4 096 (2)
<i>Ps. persicae</i>	3	31,2	31,2 (1) 15,6 (2)	250	31,2	1	1	1 024 (2) 256 (1)	2 048 (2) 324 (1)
<i>Ps. viridiflava</i>	2	31,2	62,5	500	62,5	2 (1) 1 (1)	1	1 024	1 024
<i>Ps. mors-prunorum</i>	1	31,2	62,5	250	62,5	1	1	1 024	4 096
<i>Ps. lacrymans</i>	1	31,2	31,2	250	62,5	1	1	1 024	1 024 (1) 256 (1)
<i>Ps. savastanoi</i>	1	31,2	31,2	250	62,5	1	1	1 024	1 024
<i>Ps. eichorii</i>	1	15,6	1	1 000	31,2	15,6	7,8	8 191	256
<i>Ps. phaseolicola</i>	1	15,6	62,5	62,5	125	2	1	512	64
<i>Ps. tolaasii</i>	1	31,2	62,5	1 000	1000	3,9	1		
<i>Ps. fluorescens</i>	1	31,2	62,5	500	1000	7,8	1	4 096	2 048
<i>Ps. tomato</i>	1	31,2	62,5	500	31,2	2	1	1 024	1 024
<i>Ps. marginalis</i>	1	31,2	31,2	250	62,5	1	1	1 024	1 024
<i>X. juglandis</i>	2	31,2	7,8	500	62,5	7,8	7,8	512	64
<i>X. pruni</i>	1	15,6	7,8	125	2	1	2	256	32

TABLEAU 11. CONCENTRATION MINIMA INHIBITRICE (µg/ml) DE QUELQUES BACTERIES PHYTOPATHOGENES VIS A VIS DE QUELQUES SUBSTANCES.

. Lecture : la lecture est faite après incubation de 12 à 24 heures à 25°C. La C.M.I. correspond à la concentration la plus faible d'antibiotique qui empêche la croissance bactérienne; un faible voile ou une colonie isolée sont considérés comme négligeable.

Cette méthode est intéressante pour déterminer la C.M.I. des antibiotiques vis à vis de bactéries mais elle peut être aussi utilisée pour déterminer la C.M.I. de toute substance soluble; pour des substances complexes plus ou moins solubles comme l'oxychlorure de cuivre, la C.M.I. n'a qu'une valeur indicative.

312. Résultats

Le tableau 11 récapitule les C.M.I. d'une gamme de *Pseudomonas* et de *Xanthomonas* phytopathogènes vis à vis de quelques antibiotiques : Ampicilline (β -lactamine), Kanamycine (Aminoside), Colimycine (peptide cyclique), Oxytétracycline (tétracycline), Rifampycine SV (rifamycine), Pyolutéorine (substance extraite de *Pseudomonas*) et de deux autres substances le Bronopol (2-bromo-2-nitropropane-1, 3 diol) et l'oxychlorure de cuivre ($3 \text{ CuO}, \text{CuCl}_2, 3\text{H}_2\text{O}$).

L'activité des antibiotiques peut être déterminée d'après la valeur des C.M.I. :

- . C.M.I. faible (1 à 10 $\mu\text{g/ml}$) : kanamycine, oxytétracycline
- . C.M.I. moyenne (10 à 100 $\mu\text{g/ml}$) : rifamycine SV, ampicilline
- . C.M.I. forte (> 100 $\mu\text{g/ml}$) : sulfate de colimycine, pyolutéorine.

Les antibiotiques ayant une C.M.I. de l'ordre de 1 $\mu\text{g/ml}$ sont seuls retenus en thérapeutique médicale. Dans la suite du travail nous avons retenu l'oxytétracycline, le bronopol et l'oxychlorure de cuivre. La kanamycine pourtant très active, n'a pas été retenue du fait du prix élevé de la préparation injectable utilisée.

313. Nature des substances utilisées

3131. le T.M.Q. ou composé d'ammonium quaternaire (Q) de de Terramycine (TM)

La terramycine (chlorhydrate d'oxytétracycline) est un antibiotique puissant produit par l'actinomycète *Streptomyces rimosus*. Le chlorhydrate d'oxytétracycline est entièrement soluble dans l'eau et les solvants organiques. C'est un antibiotique à large spectre, actif sur les bactéries Gram positif et Gram négatif, les Spirochètes, les Rickettsies et certains gros virus.

Le composé d'ammonium quaternaire de terramycine résulte de l'action de la terramycine sur les alkyks de chlorure de triméthyl-ammonium. Ce complexe composant actif utilisé en supplémentation de l'alimentation du bétail à la composition suivante :

. chlorhydrate de Terramycine	50 %
. composé ammonium quaternaire	14 %
. cendre dont les principaux composants sont : calcium, magnésium, sodium, potassium et silicates insolubles	21 %
. agents de fermentation	10 %
. humidité	5 %
. métaux lourds	13 ppm

De nombreux essais réalisés sur de nombreux animaux : rats, souris, poulets, le bétail, etc... ont donné les garanties générales d'emploi de cette substance. Par contre les effets secondaires sur la microflore des organes aériens des végétaux n'ont pas été étudiés et comme nous le verrons plus loin, ils sont de beaucoup les plus insidieux et les plus redoutables.

3132. Les produits cupriques

Les produits cupriques sont pratiquement les seuls produits antibactériens efficaces disponibles dans le commerce; ils ont cependant des effets phytotoxiques sur le Pêcher, espèce sur laquelle leur emploi est délicat.

La bouillie bordelaise n'est plus préparée ex tempore par l'utilisateur, par mélange de lait de chaux et de sulfate de cuivre; elle se présente sous forme de poudre prête à l'emploi dosant de 20 à 25 % de cuivre métal. Sur le Pêcher les doses employées dans le traitement de la cloque sont de 250g/hl de cuivre métal soit 1,250 kg/hl de poudre commerciale. Il est recommandé d'effectuer les traitements après l'aoûtement complet des rameaux, sur une végétation sèche et par beau temps, pour éviter les effets phytotoxiques sur les arbres. Malgré toutes ces précautions qu'il n'est pas toujours possible de respecter dans la pratique, nous avons observé un effet phytotoxique sur les feuilles (avancement de la chute complète des feuilles d'au moins 15 jours) et sur les rameaux où on observe des nécroses qui pourraient être des voies d'entrée de la bactérie dans les tissus.

L'oxychlorure de cuivre se présentant sous forme de poudre mouillable est un sel insoluble dosant 50 % de cuivre métal. A la dose de 250g de cuivre métal par hl, les effets phytotoxiques de cette préparation seraient moins graves.

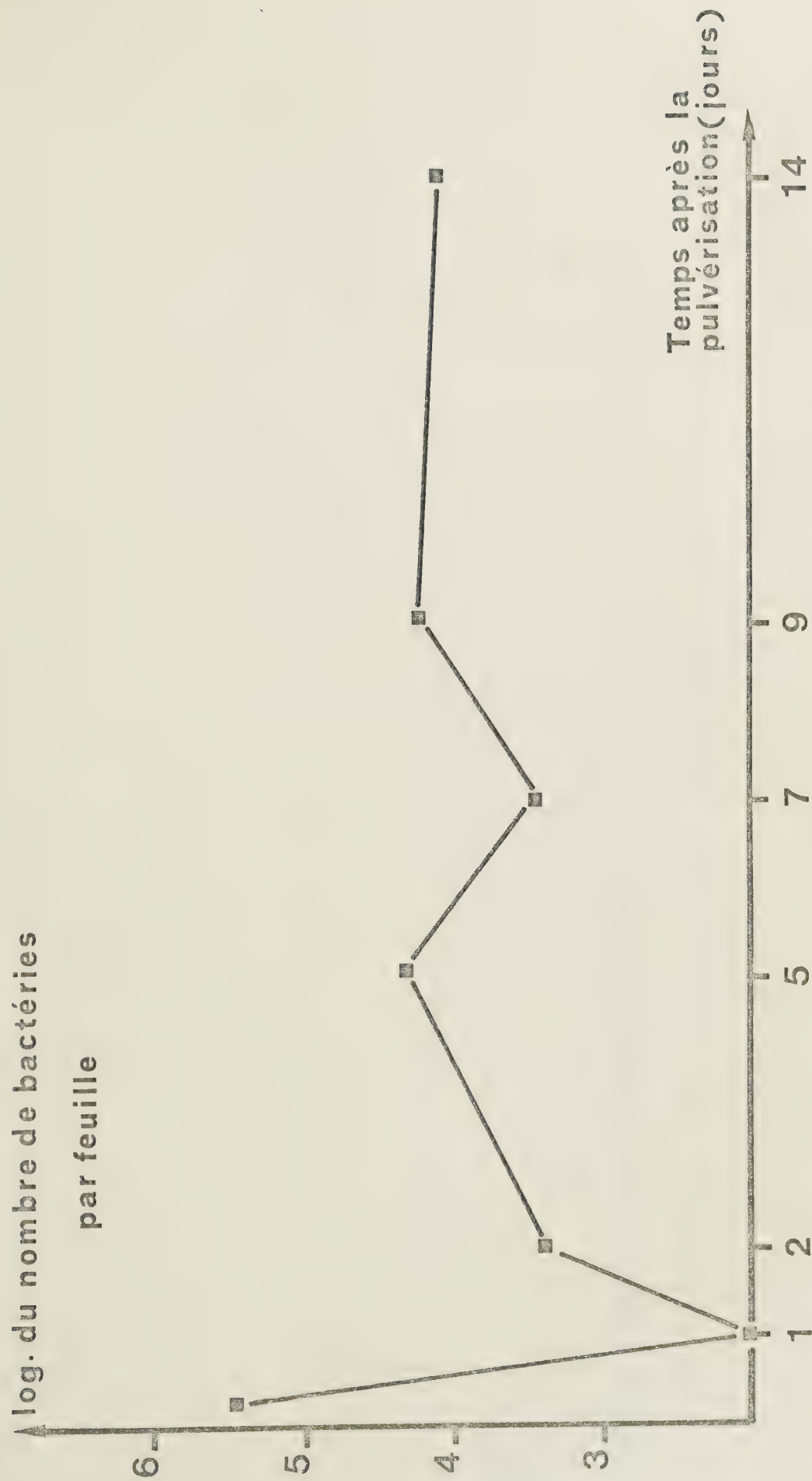


Fig. 18. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE *PS. PERSICAE* APRES PULVERISATION DE LA BACTERIE SUR LES FEUILLES.

Date de pulvérisation Date d'analyse	3.03	1.04	16.04	7.05	4.06	2.07	29.07	15.08	2.09	30.09	24.10	8.11
	2.10 ⁴	5.10 ⁴	9,5.10 ⁵	3,7.10 ⁶								
28-05-1971												
30.06	- ^v	4,5.10 ³	2,4.10 ⁴	5,3.10 ⁴	1,2.10 ⁵							
31.08	-	-	-	-	-	-	-	1,7.10 ⁵				
30.09	-	-	-	-	-	-	-	2,5.10 ⁴	4.10 ³			
4.11	-	-	-	-	-	-	-	1,5.10 ⁵	1,2.10 ⁴	1,2.10 ⁴	2,2.10 ⁴	
15.11	-	-	-	-	-	-	-	7.10 ³	1,4.10 ⁵	8,7.10 ⁴	9.10 ⁵	7.10 ³
Durée de survie (en jours)	86	91	75	54	24	< 60	< 32	107	89	61	37	7
7.4.72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3.10 ⁴	3,7.10 ⁵
Nombre de nécroses sur 8 arbres 22.03.1972	0	0	0	0	0	0	0	9	28	32	116	114

TABLEAU 12. INFLUENCE DE LA DATE DE PULVERISATION SUR LA DUREE DE SURVIE DE *PS.PERSICAE* SUR LES FEUILLES.

-^v <250 bactéries par feuille = zéro technique ou limite inférieure de détection de la méthode.

3133. Le bronopol (X)

Le bronopol est un bactéricide et bactériostatique utilisé pour lutter contre *Xanthomonas malvacearum* agent des taches anguleuses du cotonnier.

C'est une molécule simple, soluble à 25 % dans l'eau. Les C.M.I. (μ g/ml) contre les bactéries phytopathogènes varient de 12 à 50 : *Ps. mors-prunorum* (25), *Xanthomonas malvacearum* (12,5), *Agrobacterium tumefaciens* (12,5), *Erwinia amylovora* (25), *Corynebacterium fascians* (50).

32. Etude de l'activité in vivo

321. Conditions d'expérimentation

Dans un verger naturellement contaminé par *Ps. persicae* la répartition de la maladie est hétérogène et on peut imaginer des variations très importantes du nombre de bactéries par feuille d'un arbre à l'autre; ces vergers conviennent donc assez mal à des expérimentations précises.

La pulvérisation sur les feuilles d'une culture bactérienne liquide de 10^6 à 10^7 bactéries par ml, est un moyen d'obtenir un inoculum homogène. La fig. 18 montre que le nombre de bactéries présentes sur les feuilles après pulvérisation au mois de juillet par exemple, diminue rapidement pendant la première journée, puis remonte progressivement pour atteindre un niveau moyen en 5 jours, de l'ordre de 10^4 bactéries par feuille. Ce palier peut durer de 2 à 3 semaines au printemps et en été. Les bactéries présentes dans un bouillon en phase exponentielle de croissance, ne sont pas dans un état physiologique adapté à la vie sur la feuille et une grande partie meurent très rapidement après la pulvérisation. Ce choc physiologique pourrait peut-être être évité en utilisant des concentrations moins importantes de bactéries stabilisées dans l'eau stérile.

Nous avons pulvérisé *Ps. persicae* sur le feuillage, à différentes dates pendant toute la période végétative et vérifié la durée de survie épiphyllle de la bactérie après chaque implantation. Le tableau 12 montre que la durée de survie de *Ps. persicae* diminue progressivement pour les pulvérisations faites du 3 mars au 4 juin; à partir du 15 Août les bactéries implantées se maintiennent jusqu'à la chute des feuilles et le nombre de plaies pétiolaires contaminées augmente progressivement de 9 à 114 à partir des pulvérisations du 15 août. Les deux dernières implantations du 24 octobre et du 8 novembre entraînent un nombre important de nécroses autour des bourgeons dormants ce qui permet une pollution des feuilles au printemps suivant.

TABLEAU 13. ESSAI PARCELLAIRE DU 26 JUILLET AU 10 AOUT 1971.

VARIATION DU NOMBRE DE BACTERIES PAR FEUILLE APRES UN TRAITEMENT
BACTERICIDE AU T.M.Q.

Traitements Temps après traitements (jours)		Témoin eau	TMQ 100	TMQ 1000
0	(1)	25 000	22 500	5 500
	(2)	1 000	1 000	1 000
1		2 500	25	25
		1 000	10	50
2		6 250	8 500	25
		1 000	1 430	20
4		7 500	250	250
		1 000	37	150
8		6 500	12 500	250
		1 000	2 140	1 770
12		1 000	500	2 500
		1 000	550	2 250
15		500	1 750	25
		1 000	3 900	250

(1) nombre de bactéries par feuille

(2) Chiffres transformés du nombre de bactéries par feuille en ramenant le témoin à un chiffre constant 1 000.

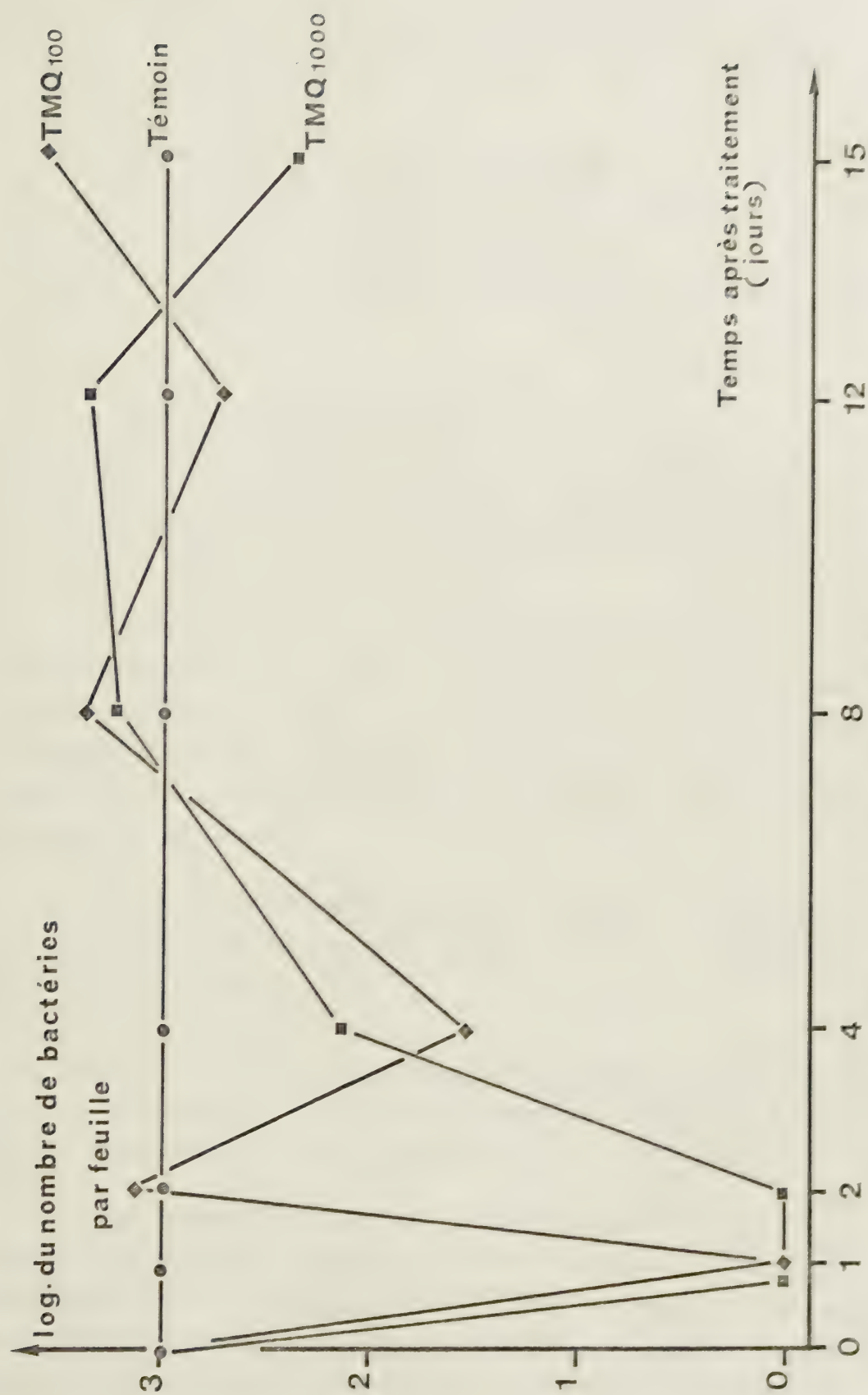


Fig. 19. ESSAI PARCELLAIRE DU 26 JUILLET AU 10 AOÛT 1971, ÉVOLUTION DU NOMBRE DE BACTÉRIES PAR FEUILLE

(CHIFFRES TRANSFORMÉS), APRÈS UN TRAITEMENT BACTÉRICIDE AU T.M.Q.

En pulvérisant *Ps. persicae* sur les feuilles de Pêcher, il est donc possible d'avoir des parcelles polluées de façon homogène et l'effet des pulvérisations de bactéricides sur l'abaissement du nombre de bactéries présentes sur les feuilles peut être étudié.

Ce travail s'effectue en deux temps :

- . présélection à Angers sur petites parcelles, soit au printemps, soit en été, afin d'éliminer les produits inefficaces,
- . expérimentation dans les vergers en Ardèche avec dispositif statistique.

322. Essais parcellaires

est de l'ordre,

En été, la durée de maintien de la bactérie à un niveau constant de 3 semaines; les essais porteront sur cette période pendant laquelle l'influence d'une seule pulvérisation bactéricide est étudiée. Le traitement n'intervient que 3 ou 4 jours après la pulvérisation de la bactérie.

Pour chaque traitement, les numérations de *Ps. persicae* sont faites par broyage de 64 feuilles dans l'eau stérile, puis dilution et étalement sur milieu gélosé. Pour ce travail, la technique de lavage des feuilles utilisée précédemment a donc été légèrement modifiée; par le broyage des feuilles on évite un contact prolongé des bactéries mises en suspension dans l'eau avec les produits pulvérisés sur la feuille.

De nombreuses expérimentations ont permis de vérifier l'intérêt des produits classiques et de nouvelles molécules; à titre d'exemple nous exposerons les résultats de deux essais.

3221. Essai Angers du 26 juillet au 10 août 1971

Cet essai comprend trois traitements répétés sur 4 arbres ; témoin pulvérisé avec de l'eau, T.M.Q. 100 µg/ml et T.M.Q. 1000 µg/ml.

Le tableau 13 et la fig. 19 donnent les résultats de cet essai. Les chiffres réels des nombres de bactéries par feuille sont transformés de façon à ramener le témoin à un chiffre constant : 1000 par exemple; les courbes obtenues avec ces chiffres transformés permettent de bien visualiser l'effet du bactéricide sur *Ps. persicae* présent sur les feuilles par rapport au témoin.

Temps après traitements (jours)	Traitements	Témoin eau	TMQ 250 µg/ ml	TMQ 1000 µg/ ml	TMQ 1000 µg/ml Oxychlorure de Cu 250 µg/ml	Oxychlorure de cuivre 250 µg/ml	Oxychlorure de cuivre 250 µg/ ml + huile
0	(1)	1 340	9 000	20 000	1 000	11 300	1 670
	(2)	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
1		1 000	100	0	0	7 300	1 000
		1 000	148	0	0	860	800
2		27 000	330	0	0	85 000	10 000
		1 000	18	0	0	370	300
4		17 000	0	100	0	3 700	300
		1 000	0	1	0	26	14
7		20 000	0	0	0	2 100	500
		1 000	0	0	0	12	16
10		25 000	670	0	0	10 000	11 300
		1 000	40	0	0	47	362
15		7 700	43 000	700	0	700	2 700
		1 000	83	6	0	107	280

(1) Nombre de bactéries par feuille.

(2) Chiffres transformés du nombre de bactéries par feuille en ramenant le témoin à un chiffre constant : 1000.

TABLEAU 14. ESSAI PARCELLAIRE DU 11 AU 26 SEPTEMBRE 1972.

VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES PAR FEUILLE APRES PLUSIEURS TRAITEMENTS BACTERICIDES.

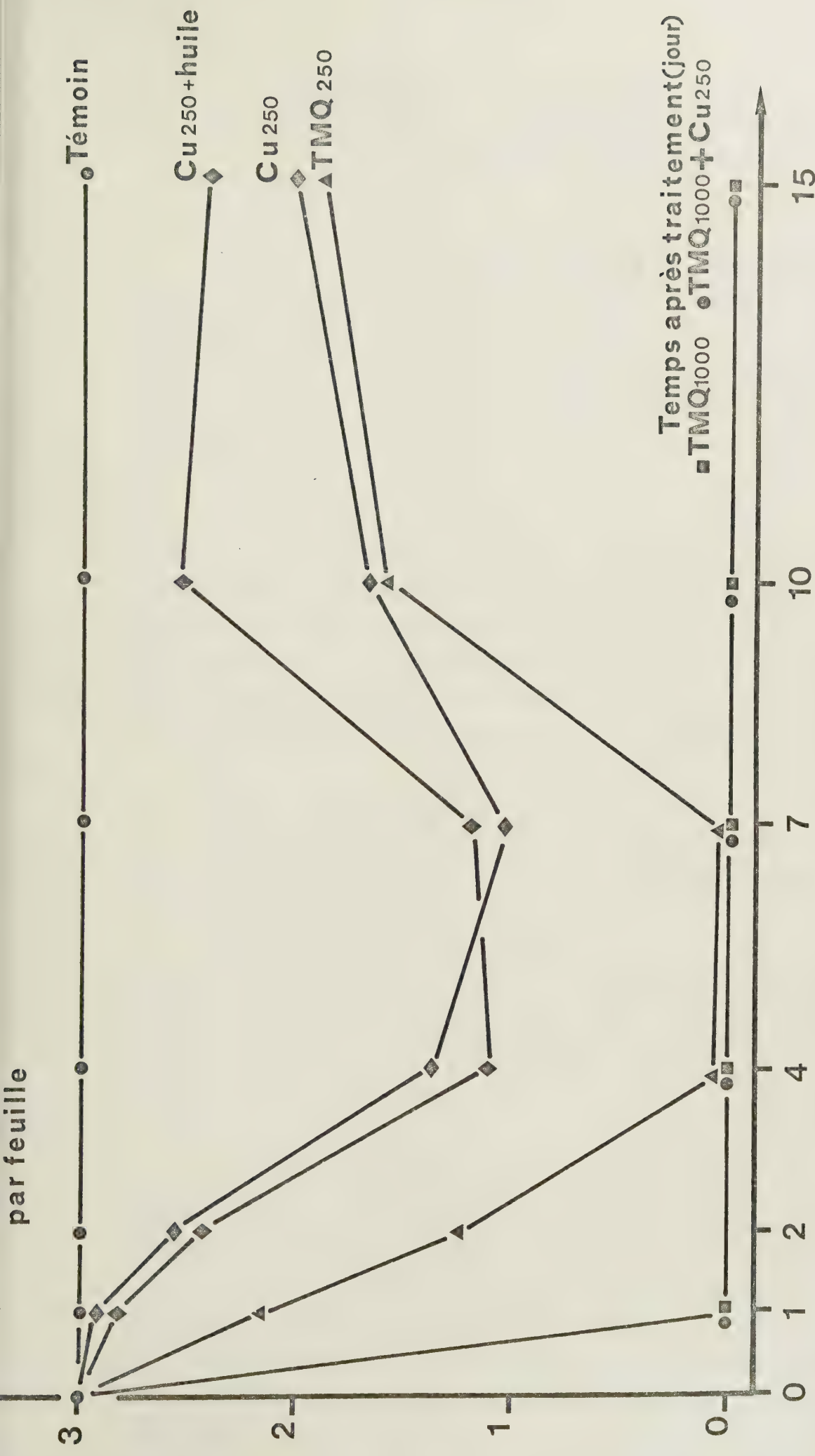


Fig. 20. ESSAI PARCELLAIRE DU 11 AU 26 SEPTEMBRE 1972. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE BACTÉRIES PAR FEUILLES (CHIFFRES TRANSFORMÉS), APRES PLUSIEURS TRAITEMENTS BACTÉRICIDES.

La fig. 19 montre que le T.M.Q. 1000 $\mu\text{g/ml}$ entraîne une diminution rapide de *Ps. persicae* au bout d'un jour, mais le nombre de bactéries augmente ensuite 3 à 4 jours après la pulvérisation; le T.M.Q. 100 a un effet peu durable.

3222. Essai Angers : 11 au 26 septembre 1972

Cet essai conduit courant septembre, comporte 6 traitements : témoin pulvérisé à l'eau, T.M.Q. 250 $\mu\text{g/ml}$, T.M.Q. 1000 $\mu\text{g/ml}$, T.M.Q. 1000 $\mu\text{g/ml}$ + oxychlorure de cuivre (250 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre métal), oxychlorure de cuivre (250 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre métal), oxychlorure de cuivre (250 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre métal plus de l'huile). Les contrôles de population sont effectués dans les mêmes conditions que précédemment.

Le tableau 14 et la fig. 20 résument les résultats des comptages du nombre de bactéries par feuille. T.M.Q. 1000 $\mu\text{g/ml}$ seul ou en mélange avec l'oxychlorure de cuivre 250 $\mu\text{g/ml}$, est efficace puisqu'il entraîne la disparition durable de la bactérie au bout d'une journée; T.M.Q. 250 $\mu\text{g/ml}$ est beaucoup moins actif puisque le nombre de bactéries ne descend à zéro qu'en 4 jours, à partir de 7 jours le nombre de bactéries augmente à nouveau. L'oxychlorure 250 $\mu\text{g/ml}$ a une action moyenne et peu prolongée sur la diminution du nombre de bactéries.

3223. Résultats

Le tableau 15 résume les résultats obtenus dans 11 essais parcellaires sur l'efficacité comparée de diverses substances sur les populations de *Ps. persica*

. Les produits cupriques

La bouillie bordelaise et l'oxychlorure ont une légère efficacité même aux doses de 2 000 à 2500 $\mu\text{g/ml}$ de cuivre métal. La phytotoxicité très importante sur les feuilles en été fausse les résultats. L'oxyquinoléate de cuivre n'a aucune phytotoxicité mais son action bactéricide est négligeable.

. Les antibiotiques

Après les essais in vitro trois substances ont été retenues : Streptomycine, kanamycine et oxytétracycline. La streptomycine provoque une diminution temporaire des populations de *Ps. persicae*. Par contre la kanamycine et l'oxytétracycline à la dose de 1000 $\mu\text{g/ml}$ entraîne une diminution nette et durable du nombre de bactéries. L'effet maximum est atteint entre 1 et 4 jours puis se prolonge plus ou moins longtemps (15j maximum). L'emploi en mélange de l'oxytétracycline et de la kanamycine n'a pas amélioré l'effet de chaque substance utilisée seule à la même dose.

TABLEAU 15*. ESSAIS PARCELLAIRES

EFFICACITE COMPAREE DE DIVERSES SUBSTANCES SEULES OU EN COMBINAISONS SUR
LES POPULATIONS DE *PS.PERSICAE*, SUR LA SURFACE DES FEUILLES DE PECHER.

	Doses (µg/ml)	Effet sur les populations bactériennes	Phytotox- icité
<u>PRODUITS CUPRIQUES</u>			
Bouillie bordelaise	2 000 (Cu)	f	+
	1 250 "	f	+
Oxychlorure de cuivre	2 500 "	f	+
	250 "	f	0
Oxyquinoléate	1 000 (MA)	0	0
	10 000 (MA)	0	0
<u>ANTIBIOTIQUES</u>			
Oxytétracycline	100	f	0
	250	+	0
	500	+	0
	1 000	+++	0
Kanamycine	1 000	+++	0
Streptomycine	1 000	f	0
<u>COMBINAISONS CUIVRE + ANTIBIOTIQUE</u>			
Oxytétracycline + oxychlorure cuivre	250/250 (Cu)	++	f
	250/1000 "	+	++
	500/250	++	f
	1 000/250 "	+++	0
	1 000/500 "	+++	++
	1 000/1000 "	+++	++
	1 000/1750 "	+	+
Oxytétracycline + oxyquinoléate de cuivre	1 000/1000(MA)	++	0
Kanamycine + oxychlorure de cuivre	1 000/1750(Cu)	+++	+
Kanamycine + oxyquinoléate de cuivre	1 000/1000(MA)	+++	0
<u>SUBSTANCES DIVERSES</u>			
2 hydroxypropyl-methanethiosulfonate	2 000	0	f
	20 000	0	++
2 bromo-2nitropropan - 1, 3 diol (bronopol)	100	0	0
	1 000	f	f
Bromure de lauryl-diméthyl-carboxyéthyl- ammonium (céquartyl)	1 000	0	0
Molécules non déterminées :			
G 454 - SEB - St - P 430 - P944 - Q 9898	1 000	0	0

Légende

	Efficacité sur les bactéries	Phytotoxicité
0	nulle	nulle
f	taux de 1/2 de l'ordre de 1/2 du témoin (T)	quelques taches
+	taux 1/2T (mais jamais chute au 0)	taches + criblure
++	chute momentanée au 0	taches, criblures, chute d'une partie des feuilles
+++	chute durable au 0	

* D'après Prunier, Luisetti, Gardan, 1974. Phytiairie, Phytopharmacie, 23, page 77.

. Combinaisons produits cupriques-antibiotiques

Les antibiotiques agissent sur les populations bactériennes au bout de 1 à 4 jours puis leur effet s'estompe; nous avons pensé que les produits cupriques plus stables pouvaient prendre le relais des antibiotiques à partir du 5ème jour ce qui permettrait de protéger les feuilles durant 10 à 15 jours. En fait, la combinaison cuivre-antibiotique n'est pas plus efficace que les produits utilisés seuls.

. Substances diverses (tableau 15)

A part le bronopol, aucune de ces substances n'est active contre *Ps. persicae*, dans nos conditions expérimentales.

322. Conclusions

Les expérimentations sont conduites de juin à septembre, à une époque peu favorable à l'implantation durable de la bactérie sur les feuilles et les interprétations des résultats ne sont pas toujours aisées du fait du nombre faible de bactéries présentes sur les feuilles du témoin.

Les conditions climatiques d'été, en plus de leur effet sur la survie des bactéries, peuvent agir sur l'activité des produits eux-mêmes; un exemple nous a été donné par le bronopol qui s'est montré efficace dans les conditions d'été (température élevée) et inactif en Ardèche à l'automne (température moyenne).

Malgré ces quelques inconvénients, les essais parcellaires ont permis de sélectionner les produits les plus intéressants seuls, ou en combinaison avec d'autres, et d'étudier leur dose optimale d'emploi.

323. Essais d'automne en Ardèche

Les conditions écologiques de la région où s'est développée la maladie semblent particulières : sol constitué d'arènes granitiques à pH acide, altitude du plateau comprise entre 400 à 600 m, climat rigoureux en hiver. Afin de mettre au point une lutte chimique efficace contre le dépérissement bactérien du Pêcher il était indispensable de mener des expérimentations au cours de l'automne, en Ardèche. Trois années d'études ont permis de montrer l'intérêt du T.M.Q. dans la lutte contre cette maladie (PRUNIER, LUISETTI, GARDAN, 1974). A titre d'exemple, nous commenterons le dernier essai réalisé en 1973-74.

log. du nombre de bactéries

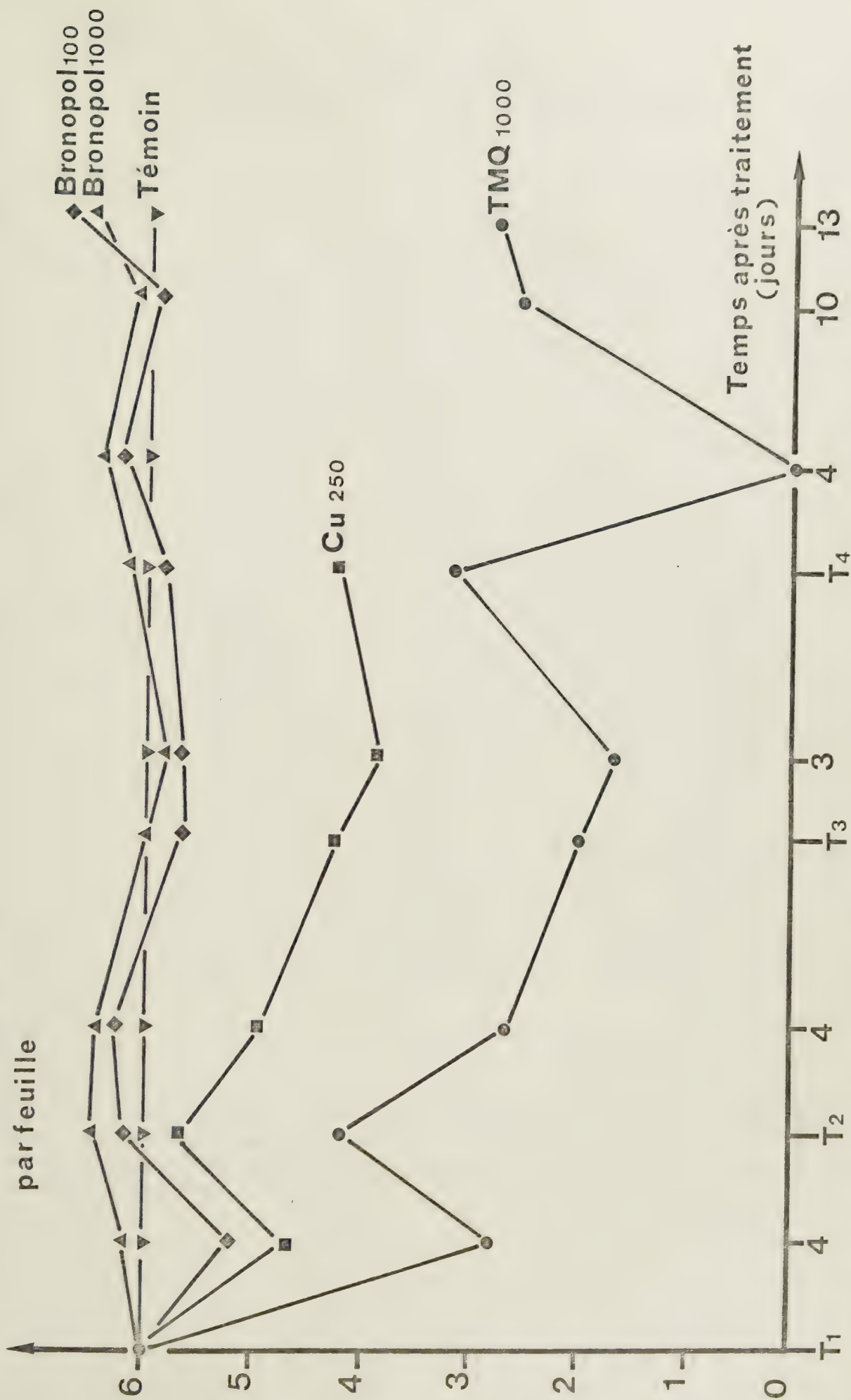


Fig. 21. ESSAI D'AUTOMNE CHEZ GAMON. VARIATION DU NOMBRE DE BACTERIES PAR FEUILLES
(CHIFFRES TRANSFORMES), APRES 4 TRAITEMENTS BACTERICIDES.

TABLEAU 16. ESSAI D'AUTOMNE CHEZ M. GAMON

VARIATIONS DU NOMBRE DE BACTERIES PAR FEUILLE APRES 4 TRAITEMENTS
BACTERICIDES.

Traitements	Témoin	TMQ 1000µg/ml	Oxychlorure de cuivre 1250 µg/ml	Bronopol 100µg/ml	Bronopol 1000 µg/ml
Temps après traite- ments (jours)					
To (1)	2 020 000	1 920 000	2 140 000	1 990 000	1 530 000
(2)	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000
T1 + 4	1 580 000	10 500	840 000	2 700 000	1 760 000
	1 000 000	698	50 200	173 000	1 468 000
T1 + 8	4 700 000	66 500	2 550 000	6 550 000	12 200 000
	1 000 000	14 850	513 000	1 420 000	3 420 000
T2 + 4	2 650 000	1 500	275 000	5 250 000	5 700 000
	1 000 000	595	97 950	2 010 000	2 838 000
T2 + 11	21 450 000	2 150	505 000	10 200 000	11 650 000
	1 000 000	105	22 240	483 100	732 900
T3 + 3	16 450 000	800	145 000	9 050 000	8 700 000
	1 000 000	51	8 320	558 500	698 300
T3 + 10	13 600 000	21 500	275 000	8 550 000	17 700 000
	1 000 000	1 660	19 100	836 800	1 637 000
T4 + 4	93 500 000	50		196 000 000	204 000 000
	1 000 000	0		2 124 000	2 945 000
T4 + 10	16 500 000	6 250		5 050 000	13 750 000
	1 000 000	399		310 500	1 100 000
T4 + 13	123 000 000	25 400		85 000 000	
	1 000 000	217		7 015 000	
Nombre de né- croses sur 20 arbres	191	17	34	127	62
Indices de vigueur	34	5	13	25	14

(1) Nombre de bactéries par feuille

(2) chiffres transformés du nombre de bactéries par feuille en ramenant le témoin à un chiffre constant 1 000 000.

3231. Conditions de l'essai

L'expérimentation est menée dans le verger de M. GAMON, situé sur le plateau de Tournon en Ardèche, sur des arbres de trois ans de la variété J.H. Hale.

L'inoculum, composé d'une suspension bactérienne de 10^6 à 10^7 germes/ml, est pulvérisé sur les feuilles le 27 septembre 1973.

Le dispositif statistique adopté, est le bloc de FISHER avec 4 répétitions; la parcelle élémentaire est constituée de 5 arbres.

L'efficacité de 3 produits est comparée à un témoin pulvérisé avec de l'eau : T.M.Q. 1000 µg/ml, oxychlorure de cuivre 1250 µg de cuivre métal, bronopol 100 µg/ml et bronopol 1000 µg/ml.

Les 4 applications des produits 4, 12, 22 octobre et 2 novembre permettent de couvrir la chute des feuilles.

Un échantillon de 100 feuilles, prélevé sur les 20 arbres correspondant à chaque traitement, est analysé comme précédemment par broyage, pour évaluer le nombre de bactéries par feuille avant et après chaque traitement.

3232. Résultats

32321. Incidence des traitements sur les populations bactériennes.

Le tableau 16 regroupe les résultats exprimés en nombre de bactéries par feuille, des analyses microbiologiques. L'effet des traitements sur la diminution du nombre de *Ps. persicae* (chiffres transformés) apparaît nettement sur la figure 21.

Ces résultats appellent quelques commentaires :

. Au premier contrôle, le nombre de bactéries par feuille pour chaque traitement est élevé et varie peu, de 1 530 000 à 2 140 000, *Ps. persicae* s'est donc bien implanté sur les feuilles.

. Chez le témoin, l'évolution des populations bactériennes confirme l'aptitude de *Ps. persicae* à se multiplier sur les feuilles en automne. Les niveaux atteints sont les plus élevés jamais obtenus et très nettement supérieurs à ceux observés dans la nature (100 fois plus).

ANALYSE STATISTIQUE

ESSAI D'AUTOMNE CHE JAMON

TABLEAU 17. NOMBRE DE NECROSES AUTOUR DES BOURGEONS DORMANTS

	Témoin	TMQ 1000µg/ml	Oxychlorure de Cu 1250µg /ml	Bronopol 100µg/ml	Bronopol 1000µg/ml	Total
Bloc 1	27	3	5	16	21	72
Bloc 2	51	5	13	48	25	149
Bloc 3	39	0	9	28	5	81
Bloc 4	74	2	7	35	11	129
Total	191	17	34	127	62	431
Moyenne	47,75	4,25	8,50	31,75	15,50	

TABLEAU 18. ANALYSE DE VARIANCE

Source de Variation	Somme des carrés des écarts	Variance	Degrés de liberté	F 0,05 calculé	F 0,05 lu
Totale	9 309	-	19	-	-
Bloc	829	276,3	3	1,01	3,49
Traitement	5 187	1 296,6	4	4,73	3,26
Résiduelle	3 293	274,4	12	-	-

TABLEAU 19. CLASSEMENT SELON LA METHODE DES RANGES DE DUNCAN

Classement	Témoin	Bronopol 100 g/ml	Bronopol 1000 g/ml	Oxychlorure de Cu 1250 g /ml	TMQ 1000 g/ml
Moyenne	47,75	31,75	15,50	8,50	4,25
	1-r5 = 19,93	NS (1)	S (2)	S	S
		2-r4 = 4,18	NS	NS	NS
			3-r3 = 0	NS	NS
				4-r2 = 0	NS

r5 = 27,82
 r4 = 27,57
 r3 = 26,74
 r2 = 25,50

(1) NS : non significatif
 (2) S : significatif

. le T.M.Q. montre une bonne action 4 jours après chaque traitement, mais l'inoculum est tel qu'on assiste après ^à une remontée du nombre de bactéries.

. L'oxychlorure de cuivre est légèrement efficace et hâte la chute des feuilles d'une douzaine de jours. Cet effet phytotoxique n'est pas négatif puisqu'il permet une régularisation de la chute des dernières feuilles portant un inoculum élevé est à l'origine de contaminations graves à l'époque de sensibilité maximale des tissus du Pêcher.

. Le bronopol qui s'était montré intéressant dans les essais parcellaires n'a aucun effet sur les bactéries en automne.

32322. Effet des produits sur le nombre de nécroses

Le but des traitements d'automne est d'abaisser le nombre de bactéries présentes sur les feuilles afin de réduire au maximum la contamination des plaies pétiolaires et consécutivement le nombre des nécroses autour des bourgeons dormants. Les tableaux 17, 18 et 19 donnent par bloc, le nombre de plaies pétiolaires contaminées comptées de janvier à fin mars 1974, l'analyse de variance et le classement des traitements selon les ranges de DUNCAN.

Par rapport au témoin, le nombre de nécroses localisées autour des bourgeons dormants est en relation avec le niveau d'inoculum obtenu au dernier comptage. A partir de l'analyse de variance, le classement selon les ranges de DUNCAN ne montre une différence significative qu'entre le témoin, bronopol 100 et les autres traitements.

32323. Incidence des traitements sur la vigueur des arbres

Le 7 mai 1974, la vigueur de chaque arbre est notée selon les indices suivants : 0 : arbre totalement indemne, 1 : quelques pousses mortes, 2 : une charpentièrre morte, 3 : deux charpentières mortes, 4 : arbre mort. Le tableau 20 permet de séparer le T.M.Q. du cuivre, et ce dernier, des autres traitements. Le T.M.Q. est le seul produit pour lequel aucun arbre mort n'est observé.

TABLEAU 20. VIGUEUR DES ARBRES

Traitements	Indices					Indices cumulés
	0	1	2	3	4	
Témoin	1	12	3	0	4	34
T.M.Q. 1000 µg/ml	17	2	0	1	0	5
Oxychlorure de Cu 1250 µg/ml	13	5	0	0	2	13
Bronopol 100 µg/ml	6	10	0	1	3	25
Bronopol 1000 µg/ml	13	4	1	0	2	14

3232. Conclusions

La sélection de produits utilisables pour lutter contre les maladies des plantes, se fait le plus souvent de façon très empirique, l'efficacité étant jugée seulement au stade final du développement de la maladie sur l'expression des symptômes. Pour le dépérissement bactérien du Pêcher, nous avons voulu suivre à la fois l'effet du produit sur la diminution du nombre de bactéries par feuille et du nombre de plaies pétiolaires contaminées, et sur la vigueur des arbres.

Nous n'avons pas étudié les perturbations écologiques de la microflore de la surface de la feuille, consécutives à l'application de produits bactéricides, qui sont peut-être très importantes. Un essai préliminaire nous a permis de constater que dix traitements avec l'oxytétracycline 1000 µg/ml à 8 jours d'intervalle aboutissaient à stériliser la surface de la feuille.

Le bilan de 3 années d'expérimentation de lutte chimique contre *Ps. persicae* est nettement positif (PRUNIER, LUISETTI, GARDAN, 1974) :

. L'efficacité moyenne des produits^{cupriques} (Bouillie bordelaise et oxychlorure de cuivre) entraîne une protection insuffisante des arbres.

. La bonne efficacité de certains antibiotiques (kanamycine et oxytétracycline) permet de diminuer le nombre de bactéries par feuille et corrélativement le nombre de plaies pétiolaires contaminées et les dégâts de la maladie sur les arbres.

. Beaucoup d'autres nouvelles formulations bactéricides ne présentent pas d'intérêt dans la lutte contre le dépérissement bactérien du Pêcher.

Les résultats obtenus avec les produits cupriques sont conformes à ceux obtenus dans le traitement des autres maladies bactériennes des plantes. Leur efficacité, bien qu'insuffisante, permet de les utiliser dans la lutte contre ces maladies. Par exemple en France, GREUTE et AVERSENG (1967) les proposent pour limiter sur Noyer, les dégâts dus à *Xanthomonas juglandis*. En Angleterre, CROSSE (1954) ne retient que la bouillie bordelaise pour lutter contre *Ps. mors-prunorum* agent du chancre bactérien du Cerisier. CAMERON (1962) aux Etats-Unis, ERCOLANI (1967) en Italie, MATTHEE et ERSKINE (1971) en Afrique du Sud notamment, conseillent les produits cupriques pour le traitement des bactérioses à *Pseudomonas* des arbres fruitiers.

Les effets phytotoxiques des produits cupriques sur les feuilles et les rameaux limitent leur utilisationsur le Pêcher. Cependant, des traitements réalisés dans de bonnes conditions (sur une végétation sèche et par beau temps) et à des doses de l'ordre de 1250 µg/ml de cuivre métal, présentent un certain intérêt pour lutter contre le dépérissement bactérien du Pêcher.

Par contre la kanamycine et l'oxytétracycline assurent une bonne protection sans la moindre phytotoxicité. Les antibiotiques ont été utilisés depuis une vingtaine d'années, pour lutter contre les maladies bactériennes des plantes. Aux Etats-Unis la streptomycine à la dose de 100 µg/ml, est utilisée pour lutter contre le feu bactérien des rosacées fruitières dû à *Erwinia amylovora* (KEIL, WILSON, 1962; SHAFFER, GOODMAN, 1970).

La méthode de lutte chimique que nous proposons est basée sur les caractéristiques biologiques de *Ps. persicae* et comprend à l'automne 4 traitements à l'oxytétracycline (1000 µg/ml), tous les 10-12 jours, pour couvrir toute la période de chute des feuilles. La pollution artificielle homogène des feuilles et la numération des bactéries après chaque traitement permettent de bien juger de l'efficacité des produits. La limite inférieure de la méthode ou zéro technique constitue un inconvénient auquel nous essayons de remédier par l'utilisation de mutants résistants à la streptomycine; l'incorporation dans le milieu de comptage de streptomycine (100 µg/ml) et d'un antifongique (actidione à 50 µg/ml) permet d'abaisser ce zéro technique à 20-25 bactéries par feuille.

En dépit de sa complexité, cette méthode de sélection de produits bactéricides efficaces contre *Ps. persicae*, est aussi intéressante pour rechercher des produits bactéricides contre les bactéries phytopathogènes qui présentent une phase épiphyte : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*.

4. PROBLEMES POSES PAR LA LUTTE CHIMIQUE

Les produits à base d'antibiotiques ne sont pas autorisés en France pour la lutte contre les maladies des plantes dues aux champignons, mycoplasmes et bactéries, alors que la streptomycine, seule ou associée à l'oxytétracycline, est employée depuis longtemps pour lutter contre le feu bactérien aux Etats-Unis (MURNEEK, 1952; DUNECAN J.C. et al., 1954). Examinons maintenant les quelques problèmes posés par l'usage des antibiotiques en phytopathologie.

41. Résistance chromosomique

La résistance chromosomique, par mutation, possède toutes les caractéristiques des mutants : c'est un phénomène rare et indépendant de l'antibiotique, le caractère acquis est stable héréditairement et transmissible. Le "taux de mutation" c'est-à-dire la probabilité d'apparition d'un mutant résistant par bactérie et par cycle de division est de 1.10^{-7} à 1.10^{-10} (CHABBERT, 1974); le taux de mutation dépend de l'antibiotique : taux élevés pour la streptomycine, les rifamycines, etc... et des bactéries. La fréquence de mutants observés dans une population varie de 1 pour 10^6 à 1 pour 10^9 bactéries. La mutation peut être d'emblée à haut niveau (résistant d'*E. coli* K 12 à 1000 µg/ml de streptomycine sélectionné dans une population sensible à 1 µg/ml) ou à plusieurs échelons; à partir d'une population sensible à 1 µg/ml de chloramphénicol il y a sélection de mutants intermédiaires résistants à 10^6 µg/ml, puis apparition dans cette nouvelle population de mutants résistants à 128 ou 300 µg/ml.

La vitesse de sélection dépend donc de la taille de la population et surtout de multiplication des bactéries. Nous avons une idée du nombre de bactéries présentes sur un arbre malade : 10^9 à 10^{10} (60 000 feuilles x 10^5 ou 10^6 bactéries) ou dans une lésion évolutive : 10^8 à 10^{10} . Le nombre de bactéries est donc suffisant pour que ce phénomène de mutation soit probable. Par contre, nous n'avons aucun renseignement sur la durée de survie et la vitesse de multiplication d'une bactérie sur la surface d'une feuille.

Un moyen simple d'éviter la sélection de mutant est d'utiliser des associations d'antibiotiques puisque le taux de mutation simultanée est égal au produit des probabilités des deux mutations, soit en moyenne $10^{-9} \times 10^{-9} = 10^{-18}$, donc extrêmement faible.

En 1971, dans la vallée du Sacramento, des mutants résistants à la streptomycine d'*Erw. amylovora* sont apparus sur des pommiers; l'emploi de la streptomycine seule à la dose de 100 µg/ml est sans doute en partie responsable de cette sélection de mutants. Pour des raisons économiques l'oxytétracycline associé à la streptomycine a été très vite abandonné (MOLLER et al., 1973).

42. Résistance extra-chromosomique

D'après CHABBERT (1974) la résistance aux principaux antibiotiques des bactéries n'est pas due à une mutation chromosomique mais à la présence de plasmides porteurs des gènes de résistance aux antibiotiques, constitués d'A.D.N. extra-chromosomique.

Ces plasmides sont des structures libres à un ou plusieurs exemplaires dans la cellule pouvant héberger aux environs de 100 gènes, dont certains gènes de résistance aux antibiotiques et aux sels de métaux lourds; ils peuvent se transférer à une bactérie homologue ou hétérologue par transduction ou par conjugaison. Le caractère infectieux de cette résistance qui peut être multiple (plusieurs gènes de résistance sur le même plasmide) est lourd de conséquence sur le plan épidémiologique. La présence de plasmides est bien connue chez toutes les entérobactéries, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*; de plus certains facteurs de résistance de *Pseudomonas* ont été transférés à des bactéries du sol : *Rhizobium*, *Agrobacterium* et *Chromobacterium* (DATTA et al., 1971).

Un bref rappel des propriétés des plasmides de résistance aux antibiotiques nous permet de nous interroger sur les conséquences écologiques de l'utilisation des antibiotiques dans la nature pour lutter contre une maladie, le dépérissement bactérien du Pêcher, par exemple. L'antibiotique peut intervenir au niveau de l'écologie bactérienne de la surface de la feuille sur laquelle il est pulvérisé et au niveau du sol, où il se retrouve par ruissellement, après pulvérisation sur les arbres.

Il pourrait tout d'abord favoriser la sélection de *Ps. persicae* résistant à un ou plusieurs antibiotiques ce qui remettrait en cause la méthode de traitement que nous proposons. Il n'est pas impossible, comme cela a déjà été montré, que ces facteurs de résistance puissent se transmettre à d'autres bactéries de la surface de la feuille et du sol.

L'oxytétracycline pourrait aussi opérer des sélections parmi les bactéries phytocommensales et en particulier chez les entérobactéries qui sont largement représentées sur la feuille de Pêcher et dans le sol. Ces bactéries ainsi sélectionnées pourraient être directement ingérées par l'homme en consommant des fruits par exemple; elles pourraient aussi se retrouver dans le sol, les eaux de ruissellement en contact avec d'autres entérobactéries pathogènes et avec lesquelles elles échangeraient leurs facteurs de résistance aux antibiotiques. Des bactéries pathogènes de l'homme ^{résistantes aux antibiotiques} pourraient donc être sélectionnées indirectement par le traitement d'une maladie bactérienne d'une plante.

Ce schéma imaginé n'est pas entièrement théorique puisqu'il a été démontré à partir des antibiotiques utilisés comme additif d'aliments du bétail : des salmonelles multirésistantes ont été trouvées dans les eaux de torrent en montagne près d'élevages de porcs recevant une alimentation supplémentée en Antibiotiques. De plus^{dans} un article récent LACY et LEARY (1975) viennent de montrer que le transfert du plasmide RPl à large spectre d'hôte était possible à partir de *Ps. aeruginosa* dans *Ps. glycinea*. Le plasmide peut être aussi reçu par *Ps. phaseolicola* à la fois *in vitro* et *in vivo* dans la plante au niveau des feuilles et des gousses.

CONCLUSION

Le dépérissement bactérien du Pêcher dû à *Ps. persicae*, maladie nouvelle pour la France, a fait l'objet depuis 1967 de recherches allant de l'isolement du germe jusqu'à la mise au point d'une méthode de lutte efficace.

Sur le plan pratique, les diverses recherches entreprises sur cette maladie permettent d'envisager la réimplantation de la culture du Pêcher jusqu' alors impossible sur le Plateau de Tournon. Des variétés peu sensibles comme Redskin comparable à J.H. Hale sur le plan de la tardivité et de la productivité, peuvent être utilisées à cet effet. De plus l'application de traitements préventifs à base d'oxytétracycline, pendant toute la chute des feuilles, doit empêcher, sinon l'apparition, du moins l'extension de la maladie dans les jeunes vergers. Ceci est important pour améliorer le budget des agriculteurs de cette région car la production de pêches donne plus de 50 % de leurs revenus.

Le travail sur cette maladie n'est pas pour autant arrêté puisqu'il sert de modèle pour des recherches plus fondamentales comme les relations hôte-parasite, l'écologie bactérienne de surface des feuilles et la lutte biologique.

B I B L I O G R A P H I E

- ARSENIJEVIC M., 1968. *Ps. syringae* (Van Hall) *Ps. mors-prunorum* Wormald as Apricot parasite in Yugoslavia. IV th international symposium on Apricots and Apricot culture. Subotia - Yugoslavia. Int. Soc. Hort. Science, 3, 11, 393-402.
1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8ème édition. The William et Wilkins Company Baltimore.
- BILLING E., HUTSON R.A., 1975. Interaction between *Erwinia amylovora* and related saprophytic bacteria. I.S.P.P. plant bacteriology section. Working group "The ecology of plant pathogenic bacteria on aerial structures of plants". Wye 2-5 th sept. 1975. Summaries.
- BRADBURY J.F., 1967. C.M.I. description of pathogenic fungi and bacteria. *Ps. mors-prunorum*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, Set 13, n°125.
- CAMERON H.R., 1962. Diseases of deciduous fruit trees incited by *Ps. syringae* Van Hall A review of the literature with additionnal data. Technical bulletin experiment station, Oregon, State University Corvallis, 66, 1-64.
- CHABBERT Y.A., 1972. Dans TECHNIQUES EN BACTERIOLOGIE. II. Antibiotiques en bacteriologie médicale, Flammarion, 143-244.
- CHABBERT Y.A., 1973. Données actuelles sur la résistance des bactéries aux Antibiotiques. Actualités Pharmacologiques, 26ème série, Masson 27-60.
- CIVEROLO E.L., 1972. Interaction between bacteria and bacteriophages on plant surfaces and in plant tissues. Proceedings of the third international conference on plant pathogenic bacteria Wageningen 14-21. April 1971, 25-38.
- COLENO A., HINGAND L. 1975. Epiphytic life of *X. vesicatoria* on pepper leaves. I.S.P.P. plant bacteriology section. Working group "The ecology of plant pathogenic bacteria on aerial structures of plants" Wye 2-5th Sep. 1975, Summaries.
- CROSSE J.E., 1953a. Bacterial diseases of stone-fruit trees in Britain. IX. Bacteriosis on Apricot. Trans . Brit. Mycol. Soc., 36, 38-45.
- CROSSE J.E., 1953b. Bacterial canker, leaf spot, and shoot wilt of Cherry and Plum. Rept. E. Malling Res. Sta., 202-207.
- CROSSE J.E., 1954. Bacterial canker, leaf spot, and shoot wilt of cherry and Plum. Ann. Rept. E. Malling Res. Stat for 1959, 202-207.
- CROSSE J.E., 1955. Bacterial canker of stone-fruits. I. Field observations on the avenues of autumnal infection of Cherry. J. Hort. Sci., 30, 131-142.
- CROSSE J.E., 1959. Bacterial canker of stone-fruits. IV. Investigation of a method for measuring the inoculum potential of cherry trees. Ann. appl. Biol. 47 (2), 306-317.

- CROSSE J.E., 1963. Bacterial canker of stone fruits. V. A comparison of leaf surface populations of *Ps. mors-prunorum* in autumn on two cherry varieties. Ann. Appl. Biol., 52, 96-104.
- C.T.I.F.L., 1973. La pêche, dossier économique. p. 70-71.
- DATTA N., HEDGES R.W., SHAY E.J., 1971. Bacterial plasmids and antibiotic resistance. Symp. Smolenice Springer Edit. 23-30.
- DEFONTAINES M., 1967. Influence de l'excès d'eau sur des vergers de Pêchers en Moyen-Vivarais. C.R. Acad. Agric. Fr., 53, 957-961.
- DHANVANTARI B.N., 1973. Population dynamics of *X. pruni* on peach bud flora. Second International congress of plant pathology of Minneapolis 5-12 Sept. 1973. Abstr. 0812.
- DOWLER M.W., PETERSEN D.H., 1963. Time of pruning and infection of peach trees by *Ps. syringae*. Phytopath., 53, 874.
- DOWLER W.M., PETERSEN D.H., 1966. Induction of bacterial canker of Peach in the field. Phytopath., 56, 8, 989-990.
- DUNECAN J.C., KIENHOLZ J.R., WILSON R.A., MORRIS W.T. 1954. Control of pear blight by a streptomycin-terramycin mixture. Plant Dis. Rep., 38, 666-669.
- DYE D.W., 1964. Blast of stone fruits in New Zealand. New Zeal. J. Sci. Techn., 35 A, 451-461.
- DYE D.W., 1969. A taxonomic study of the genus *ERWINIA*. IV. "Atypical" *Erwinias*. N.Z. J. Sci., 7, 833-839.
- ERCOLANI G.L., 1975. Quantitative aspects of the colonization of olive leaves by *Pseudomonas savastanoi* and associated bacteria. I.S.P.P. plant bacteriology section Working group "The ecology of plant pathogenic bacteria on aerial structures of plants". Wye 2-5th Sept. 1975. Summaries.
- ERCOLANI G.L. 1967. Aspetti di *Pseudomonas syringae* nei frutti emiliani. Inf. fitopatol., 9, 250-213.
- ENGLISH J., DAVIS J.R., 1960. The source of inoculum for bacterial canker and blast of stone fruit trees. Phytopathol., 50, 9, 634 (Abstract).
- FREIGOUN J.O., 1975. Factors affecting survival *Ps. mors-prunorum* on the leaf surface of Cherry. I.S.P.P. plant bacteriology section. Working group "The ecology of plant pathogenic bacteria on aerial structures of plant Wye 2-6 Sep. 1975. Summaries.
- GARDAN L., LUISETTI J., PRUNIER J.P., 1971. Premiers résultats sur la sensibilité variétale du Pêcher au dépérissement bactérien (*Ps. mors-prunorum* f. *sp. persicae*). C.R. Acad. Agric. Fr., 57, 1090-1093.
- GARDAN L., PRUNIER J.P., LUISETTI J., 1972. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. IV. Recherches et étude des variations de *Ps. mors-prunorum* f. *sp. persicae* à la surface des feuilles de Pêcher. Ann. Phytopathol., 4, (3), 229-244.

- GARDAN L., PRUNIER J.P., LUISETTI J. 1973a. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. VII. Responsabilité de divers *Pseudomonas* dans le dépérissement bactérien de l'Abricotier en France. Revue de Zoologie agricole et de Pathologie Végétale, 4, 112-120.
- GARDAN L., LUISETTI J., PRUNIER J.P., 1973b. Quelques aspects épidémiologiques de la bactériose du Noyer (*X. juglandis*). Ann. Phytopathol., 6, (2), 222 (Abstr.).
- GRENTE J., AVERSENG P.J., 1967. Essais de lutte contre la bactériose du Noyer. Phytiairie phytopharmacie. 16, 177-186.
- GROSCLAUDE M.C., 1969. La nécrose hivernale des rameaux de Pêcher. Reproduction expérimentale des symptômes à la suite de traitements pesticides. Revue de Zoologie agricole et appliquée, 1-3, 26-36.
- HAYWARD A.C., WATERSON J.M., 1965. C.M.I. description of pathogenic fungi and bacteria, *Ps. syringae*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, set 5 n°46.
- HEYNS A.J., 1960. Bacterial canker on Apricot trees. South Africa Journal of Sci., 3, (3), 449-456.
- HEYNS A.J., MATTHEE F.N., 1959. Bacterial canker of stone fruits. I. The disease. The Deci uous fruit grower, 19, (10), 307-310.
- JENSEN V., 1971. The bacterial flora of beech leaves. Ecology of leaf surface micro-organisms. Academic press, New-York, 463-469.
- JOUANNEAU H., 1960. Quelques aspects des maladies bactériennes des arbres fruitiers. 1. Données générales. Congrès pomologique de France, Paris. 255-264.
- KEIL H., WILSON R.A., 1962. Six years of testing streptomycin-oxytetracyclin for control of fire-blight on Bartlett pear. Plant dis. report. 46, (6), 15, 397-400.
- LACY G.H., LEARY J.V., 1975. transfer of antibiotic resistance plasmid RP1 into *Ps. glynicea* and *Ps. phaseolicola* in vitro and in planta. J. of Gen. Microbiol., 88, 49-57.
- LE MINOR L., 1972. Le diagnostic de laboratoire des bacilles à Gram négatif : ENTEROBACTERIES T.I., 4ème édition. LA TOURELLE.
- LELLIOTT R.A., BILLING E., HAYWARD A.C., 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. J. appl. Bacteriol., 29, (3), 470-489.
- LUISETTI J., PAULIN J.P., 1972. Etude sur les bactérioses des arbres fruitiers. III. Recherche de *Ps. syringae* à la surface des organes aériens du Poirier et étude des variations quantitatives. Ann. Phytopathol., 4, (3), 215-227.
- LUISETTI J., PRUNIER J.P., GARDAN L., 1972. Un milieu pour la mise en évidence de la production d'un pigment fluorescent par *Ps. mors-prunorum* f. sp. *persicae*. Ann. Phytopathol., 4, (3), 295-296.
- LUISETTI J., GARDAN L., PRUNIER J.P., 1974. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. VI. Etude du pouvoir pathogène de *Pseudomonas mors-prunorum* f. sp. *persicae*. Influence de la dose d'inoculum. Ann. Phytopathol., 5, (4), 347-353.

- LUISETTI J., JAILLOUX F., GERMAIN E., PRUNIER J.P., GARDAN L. 1975. Caractérisation de *Xanthomonas corylina* (Miller et al.) Starr et Burkholder responsable de la bactériose du Noisetier récemment observée en France. C.R. Acad. Agric. Fr., (à paraître).
- LUISETTI J., GARDAN L., PRUNIER J.P. (à paraître). Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. IX. Caractérisation d'entérobactéries isolées du microbisme de surface des feuilles de Pêcher.
- MANGENOT F., 1966. Colloque de la section de microbiologie du sol du 3 et 4 février 1966. Annales de l'Institut Pasteur. Supplément au n°3, T.III, 329-341.
- MATTHEE F.N., ESRKINE J.V., 1971. Bacterial canker of stone fruits. The Deciduous Fruit Grower, 8, 21, 204-206.
- MILLER T.D., SCHROTH M.N., 1972. Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopath. 62 (10), 1175-1182.
- MOLLER W.J., BEUTEL J.A., REEL W.O., PERRY F.J., SCHROTH M.N., 1973. Streptomycin resistant fire blight control studies. Calif. Agr. 27, 4-5.
- MURNEEK A.E., 1952. Thiolutin as a possible inhibitor of fire blight. Phytopathol. 42, 57-61.
- OTTA J.D., ENGLISH H., 1970. Epidemiology of the bacterial disease of french prune. Abstract : Plant disease reporter, 54, 4.
- PANAGOPOULOS C.G., CROSSE J.E., 1964. Blossom blight and related symptoms caused by *Ps. syringae* Van Hall on pear trees. Annual report of the East Malling Research Station for 1963, 119-122.
- PANAGOPOULOS C.G. 1966. Studies on the source of inoculum for blast and black pit of Citrus. Proceedings of the first congress of the Mediterranean Phytopathological Union Bari Naples, 340-345.
- PANAGOPOULOS C.G., PSALLIDAS P.G., 1973. Studies on the epiphyllous *Pseudomonads* and other bacteria isolated from *Citrus*. I.S.P.P. plant bacteriology section. Working party on "*Pseudomonas syringae* group. Angers 2-6Apr. 1973, 67-78.
- PAULIN J.P., SAMSON Régine, 1975. Bacteria antagoniste to *Erwinia amylovora* in the microflora of fire blight host plants. I.S.P.P. plant bacteriology section. Working group "The ecology of plant pathogenic bacteria on aerial structures of plant. Wye 2-5 th Sept. 1975. Summaries.
- PRUNIER J.P., KAISER P., 1964. Etude de l'activité pectinolytique chez des bactéries phytopathogènes et saprophytes des plantes. I. Recherches des enzymes pectinolytiques. Ann. Epiphyties, 15, (3), 205-219.
- PRUNIER J.P., LUISETTI J., GARDAN L., 1970. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. II. Caractérisation d'un *Pseudomonas* non fluorescent agent d'une nouvelle bactériose du Pêcher. Ann. Phytopathol., 2 (1), 181-197.
- PRUNIER J.P., LUISETTI J., GARDAN L., 1974. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. V. Etude du pouvoir pathogène de *Pseudomonas mors-prunorum* f. sp. *persicae* agent du dépérissement bactérien du Pêcher. Méthologie : premiers résultats sur l'influence de la date d'inoculation. Ann. Phytopathol., 5, (4), 327-346.

- PRUNIER J.P., LUISETTI J., GARDAN L., 1974. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. Essais de lutte chimique contre le dépérissement bactérien du Pêcher en France. *Phytiatrie-Phytopharmacie*, 23, 71-88.
- RIDE M., SUTIC D., 1957. Un dessèchement des pousses de poirier. *C.R. Acad. Agric. Fr.*, 44, 384-387.
- RIDE M., 1960. Quelques aspects des maladies bactériennes des arbres fruitiers. II. Quatre maladies bactériennes importantes des arbres fruitiers. Congrès pomologique de France, Paris 264-292.
- RIDE M., 1961. Les maladies bactériennes des arbres fruitiers. Rapport Général du Congrès Pomologique de Bordeaux. 363-368.
- RIDE M., 1962. Les bactérioses des arbres fruitiers. *B.T.I.*, 167, 1-18.
- RIDE M., 1963. Connaissances actuelles sur le chancre bactérien du Peuplier dû à *Aplanobacterium populi*. F.A.O./C.I.P., 1963.
- RIDE M., 1968. Les bactérioses et viroses des arbres fruitiers. Collection G. VIENNOT-BOURGIN, Ed. Ponsot, 1-125.
- RIDE M., RIDE S., 1975. A comparative ^{study} of population dynamics of *Aplanobacter populi* applied to a resistant clone and a susceptible clone of poplar. I.S.P.P plant bacteriology section. Working group "The ecology of plant pathogenic bacteria on aerial structures of plants". Wye 2-5th Sept. 1975 Summaries.
- ROZSNYAY S., KLEMENTS Z., VISNYOVSKY E., 1971. The role of *Ps. syringae* in apoplexy of Apricots in Hungary. *Nôvenyvedelen (Plant protection)*, 7, 11, 481-488.
- RUINEN J., 1961. The phyllosphere. I. An ecologically neglected milieu. *Plant and soil*, 15, 2, 81-109.
- SAMSON R., PAULIN J.P., RIDE M., 1973. Le feu bactérien en France, I. Découverte et localisation d'un foyer dans la région de Dunkerque. *Ann. Phytopathol* 5, (2), 183-186.
- SHAFFER W.H., GOODMAN R.N., 1970. Control of twig blight fire-blight on apple trees with a combinaison spray of streptomycin, surfur and glyodin. *Plant dis. report.*, 54, 3, 203-205.
- STANIER R.Y., PALLERONI N.J. DOUDOROFF M., 1966. The aerobic Pseudomonads : a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.*, 43, 159-171.
- TYSSET C., BRISOU J., DURAND C. 1971. Quelques germes à Gram isolé de plantes (plantes ornementales, fruits, légumes) du sud-est de la France susceptibles d'avoir une action agressive sur les animaux homéothermes et poikilothermes. *Bulletin de l'Association des Diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy*, 123, 1-20.
- VIGOUROUX A., BLACHE M., 1967. Un nouveau dépérissement du Pêcher dans l'Ardèche. *Phytoma*, 192, 34-35.
- VIGOUROUX A., 1968. Premières observations sur une nouvelle bactériose du Pêcher. *C.R. Acad. Agric. de France*, 54, 1021-1026.

- VIGOUROUX A., 1970. Etudes sur les bactérioses des arbres fruitiers. I. Une nouvelle bactériose du Pêcher : description, étiologie, développement du parasite. Ann. Phytopathol., 2, (1), 155-197.
- VIGOUROUX A., 1972. Comportement variétal du Pêcher au dépérissement bactérien dans les conditions favorables à la maladie. C.R. Acad. Agric. de France 58, 1387-1391.
- WILSON E.E., 1931. A comparison of *Ps. prunicola* with a canker-producing bacterium of stone-fruit trees in California. Phytopathology. 21, 1153-1161.
- WILSON E.E., 1933. Bacterial canker of stone-fruit trees in California. Hilgardia 8, 83-123.
- X. Bronopol. Technical data. The boots company. Research department. Lenton research station. Nottingham, 7301.

VU :

Le Président de la Thèse

VU :

Le Directeur de Thèse.

VU et APPROUVE

RENNES, 1e

Le Directeur de l'U.E.R.

VU et PERMIS D'IMPRIMER

RENNES, 1e

Le Président de l'Université de RENNES,

C. CHAMPAUD.

